

Prävalenz der Proteasen von *Tannerella forsythia* in subgingivaler Plaque

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Sebastian Gäßner
geboren am 08.08.83 in Leipzig

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Pfister, Jena**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Holger Jentsch, Leipzig**
- 3. Gutachter: PD Dr. Arndt Güntsch, Jena**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.02.2012

Abkürzungsverzeichnis

A.a./A. actinomycetemcomitans	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
ATCC	American Type Culture Collection
DNA	Desoxyribonuclein acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F.n./F. nucleatum	Fusobakterium nucleatum
LMW – Marker	Low molecular weight - Marker
mRNA	messenger Ribonucleic acid
P.g./P. gingivalis	Porphyromonas gingivalis
P.i./P. intermedia	Prevotella intermedia
P.n./P. nigrescens	Prevotella nigrescens
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
T.d./T. denticola	Treponema denticola
T.f./T. forsythia	Tannerella forsythia

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Parodontitis	3
2.1.1	Epidemiologie der Parodontitis	3
2.1.2	Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis	3
2.1.3	Klinische Formen der Parodontitis	4
2.2	Parodontopathogene Mikroorganismen.....	6
2.3	Tannerella forsythia	7
3	Zielstellung	11
4	Methodik.....	12
4.1	Konventionelle PCR	12
4.1.1	Patientenproben.....	12
4.1.2	DNA-Extraktion	12
4.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	14
4.2	Nachweis von parodontopathogenen Bakterien mittels micro-Ident® Test ..	20
4.2.1	Probengewinnung und DNA-Isolierung.....	20
4.2.2	Multiplex-Amplifikation (PCR)	21
4.2.3	Hybridisierung	21
4.2.4	Auswertung des DNA-STRIP®	22
4.3	mRNA Expression von Proteasen Genen	23
4.3.1	Isolation von RNA (mRNA Extraktion)	23
4.3.2	Reverse Transkriptase.....	24
4.3.3	Polymerase Kettenreaktion	25
5	Ergebnisse	26
5.1	PCR.....	26
5.1.1	Nachweis von Tannerella forsythia	26

5.1.2	Nachweis der Proteasen	27
5.1.3	Zusammenfassung aller Proteasen	36
5.2	micro-Ident® PCR	39
5.3	mRNA Expression von Proteasengenen	43
6	Diskussion	44
6.1	Prävalenz von T. forsythia und deren Proteasen im gingivalen Sulkus	44
6.2	Nachweis von T. forsythia mittels micro-Ident	47
6.3	mRNA Expression von Proteasengenen	48
7	Schlussfolgerung	49
8	Literaturverzeichnis	50
9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	59
9.1	Abbildungen	59
9.2	Tabellen	60
10	Danksagung	61
11	Lebenslauf	62
12	Ehrenwörtliche Erklärung	63

1 Zusammenfassung

Der progrediente Abbau von Strukturen des Zahnhalteapparates stellt das wesentliche Merkmal der heute als Volkskrankheit anerkannten Parodontitis dar, welche in letzter Konsequenz zum Zahnverlust führt. In der oralen Mikrobiologie sind derzeit über 500 Bakterienarten und Unterarten bekannt, welche aus sub- und supragingivalen Plaqueproben isoliert werden konnten. Neben *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia* zählt auch *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) zur Gruppe der proteolytisch aktiven Spezies parodontitisassoziierter Bakterien. Im Vergleich zu *P. gingivalis* und deren umfangreichen Untersuchungen ist über die Proteasen von *T. forsythia* nur wenig bekannt. Aus diesem Grund beschäftigt sich diese Studie mit der mikrobiologischen Diagnostik von *T. forsythia* und der Prävalenz einzelner Proteasen.

Im ersten Teilversuch stand nach ausgiebiger Primerauswahl die konventionelle PCR im Vordergrund, um *T. forsythia* und deren diverse Proteasen, wie z.B. Karipsin oder Bartolysin, nachzuweisen. Die mikrobiologische Diagnostik erfolgte von 68 subgingivalen Plaqueproben (68 Patienten), davon 43 Patienten mit einer chronischen Parodontitis, 19 Patienten mit einer aggressiven Parodontitis und sechs parodontal gesunde Personen.

Der zweite Teilversuch stand im Zeichen des quantitativen Vorkommens von *T. forsythia* und anderen parodontopathogenen Mikroorganismen aus unterschiedlichen Taschentiefen von 10 Parodontitispatienten. Die micro-Ident® PCR stellte ein zuverlässiges, semiquantitatives Messverfahren dar, welches auf visueller Beurteilung der Bandenstärke eines DNA-Teststreifen beruhte.

Im dritten Teilversuch sollte das Vorhandensein einzelner Proteasen im gingivalen Sulkus nachgewiesen werden. Dabei wurde von fünf Patientenproben die mRNA Expression vier ausgewählter Proteasengene bestimmt.

Mittels konventioneller PCR konnte *T. forsythia* in allen drei Untersuchungsgruppen nachgewiesen werden. Dabei war in der Gruppe der aggressiven Parodontitis mit einer Prävalenz von 89% die Spezies am häufigsten vertreten. Jedoch war kein gravierender Unterschied im Verteilungsmuster zwischen beiden Parodontitiden zu verzeichnen. Im Hinblick auf die Prävalenz der Proteasen wurde die „putative serine protease“ auffällig, welche bei 100% aller „*T. forsythia* positiv“ getesteten Proben detektiert wurde. Ähnlich häufig wurden die Banden von Karipsin, Karilysin und auch der „putative subtilisin-like protease“ im Elektrophoresegel sichtbar. Die größte Zahl an Proteasen wurde bei chronischer Parodontitis nachgewiesen. Dieses Kollektiv verfügte zu 54% über alle neun Proteasen und damit über doppelt so viele wie Probanden mit aggressiver Parodontitis.

Anschließend ließ sich mittels micro-Ident[®] PCR eine starke Assoziation von Taschentiefe und Keimkonzentration aller parodontopathogener Mikroorganismen feststellen. Besonders hohe Keimkonzentrationen in Taschentiefen von 6mm wiesen die Spätbesiedler *T. forsythia* und *P. gingivalis*, als auch *A. actinomycetemcomitans* auf.

Die mRNA Expression von Proteasengenen konnte im letzten Teilversuch bewiesen werden. Über mRNA Extraktion und reversen Transkriptase in eine cDNA konnte mittels konventioneller PCR der positive Nachweis für die Aktivität der Proteasengene Bartolysin, Karilysin und Mirolysin erbracht werden. Es wird angenommen, dass die erwähnten Proteasen im Sulkus mit ihrer proteolytischen Aktivität Bedeutung haben.

2 Einleitung

2.1 Parodontitis

Parodontitis ist eine Erkrankung des Zahnhalteapparates bakteriellen Ursprungs, welche sowohl das Weichgewebe in Form von parodontalen Taschen als auch den umgebenen Knochen irreversibel schädigt. Der destruktive Knochenabbau führt zu Zahnlockerung und kann Zahnverlust zur Folge haben.

2.1.1 Epidemiologie der Parodontitis

Etwa ab dem fünften Lebensjahrzehnt treten parodontale Probleme als Extraktionsursache in den Vordergrund. Die Parodontitis scheint in 30 bis 35% der Fälle die Ursache für den Zahnverlust zu sein (Heidemann 2005).

In der Bundesrepublik Deutschland liegen nur wenige relevante epidemiologische Studien vor. Jedoch lässt sich im Allgemeinen anhand der Ergebnisse darauf schließen, dass bereits im Kindes- und Jugendalter eine hohe Parodontitisprävalenz zu verzeichnen ist, die mit zunehmendem Alter stetig steigt.

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis

Die Pathogenese der Parodontitis stellt eine komplexe Interaktion zwischen Mikroorganismen und der Immunabwehr des Wirts dar (Kohal und Dennison 2000). Der parodontale Entzündungsprozess ist in der Regel auf eine Verschiebung des mikrobiellen Keimspektrums in der Mundhöhle, speziell im subgingivalen Bereich, zurückzuführen. Zwar werden parodontopathogene Bakterien als wesentliche auslösende Agenzien parodontaler Erkrankungen angesehen, letztendlich wird die parodontale Destruktion aber durch die Wirtsantwort auf diese bakterielle Herausforderung hervorgerufen (Offenbacher 1996).

Rauchen konnte als klarer Risikofaktor für Parodontitiden identifiziert werden, es besteht eine Dosisabhängigkeit (Micheelis und Reich 1999, Heitz-Mayfield 2005).

Patienten mit einem unbehandelten oder ungenügend eingestellten Diabetes mellitus besitzen ein größeres Risiko, an einer Parodontitis zu erkranken (Heitz-Mayfield 2005). Unter den systemischen Erkrankungen konnte allein dem Diabetes mellitus eine positive Assoziation mit einem klinischen Attachmentverlust zugeschrieben werden (Grossi et al. 1994).

Genetische Faktoren werden ebenso als Risikofaktoren diskutiert. In den letzten Jahren stellten verschiedene Genpolymorphismen bei der chronischen Parodontitis den Gegenstand umfangreicher Untersuchungen dar. Als Beispiele dienen der Interleukin-1-Polymorphismus (Freyer 2003), sowie der TNF- α -Polymorphismus (D'Aiuto et al. 2004).

Neben ungesunder Ernährung und Alkoholkonsum kann auch psychischer Stress klinisch zu Attachmentverlust und Abbau von Alveolarknochen führen (Hugoson et al., 2002; Pistorius et al., 2002; Wimmer et al., 2002). Ein möglicher Mechanismus wäre der Anstieg der IL-6 Produktion als Reaktion auf psychischen Stress. (Kiecolt-Glaser et al., 2003). Es spricht jedoch auch einiges dafür, dass Individuen unter Stress weniger gute Mundhygiene betreiben und sich schlechter ernähren (Croucher et al 1997).

Die ethnische Zugehörigkeit, der Bildungsstand und sozioökonomische Bedingungen haben auch einen Einfluss auf die Etablierung von Parodontitiden (Borell et al. 2006).

2.1.3 Klinische Formen der Parodontitis

Die derzeit gültige Klassifizierung wurde 1999 im „International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions“ festgelegt. Sie unterscheidet die heterogene Gruppe der Parodontitiden ätiologisch und nimmt eine schweregrad-bezogene Einteilung vor, während die altersabhängige Beschreibung entfällt (Armitage 1999).

Diese Einteilung unterscheidet folgende Formen parodontaler Erkrankungen:

- Gingivale Erkrankungen (plaqueinduziert / nicht plaqueinduziert)
- Chronische Parodontitis (lokalisiert / generalisiert)
- Aggressive Parodontitis (lokalisiert / generalisiert)
- Parodontitis als Manifestation einer Systemerkrankung
- Nekrotisierende Parodontalerkrankungen
- Abszesse des Parodonts
- Parodontitis im Zusammenhang mit endodontischen Läsionen
- Entwicklungsbedingte oder erworbenen Deformationen und Zustände

Die zwei wichtigsten klinischen Formen sind die chronische und die aggressive Parodontitis. Beide Krankheitsbilder werden in „lokalisiert“ oder „generalisiert“ unterteilt. Ist der Befall niedriger oder gleich 30% aller Zähne, spricht man von lokalisiert, darüber hinausgehend von generalisiert. Ein Attachmentverlust von 1-2 mm gilt als leicht, von 3-4 mm wird als mittel gewertet, ab 5 mm von schwer gesprochen (Armitage 1999). Beide Erkrankungen sind durch weitere Merkmale gekennzeichnet:

- Die chronische Parodontitis tritt typischerweise im fortgeschrittenen Alter auf, ist für den Betroffenen zumeist schmerzfrei und kann mit Blutung assoziiert sein. Durch die charakteristische Plaqueakkumulation als ätiologischem Hauptagens und Konkrementablagerung kommt es zu chronischen Entzündungszeichen, die Pusaustritt aus den Taschen, damit verbundenem Knochenabbau und gesteigerte Zahnmobilität zur Folge haben. Neben der erwähnten Taschenbildung stellen gingivale Rezessionen ein weiteres Kardinalsymptom dar. Die Entstehung der Parodontaltaschen wird zum einen direkt durch die Mikroorganismen, zum anderen durch potenziell schädliche Nebenwirkungen der Entzündungsreaktion, mit der der Wirt auf die Ansammlung von Plaque reagiert, bedingt (Marsh, 2003). Häufige Begleiterscheinung ist Foetor ex ore. Nach dem Ausbreitungsgrad unterscheidet man eine lokalisierte von einer generalisierten Form (Lindhe et al. 1999).

Vorläufer einer jeden chronischen Parodontitis ist eine Gingivitis, hervorgerufen durch Plaque, die sich in einer schmerzfreien, blutenden Hyperplasie äußert. Somit geht jeder Parodontitis eine Gingivitis voraus, aber nicht jede Gingivitis geht in eine Parodontitis über (Baelum et al. 1988). Allgemein ist bekannt, dass der fließende Übergang der Gingivitis in eine Parodontitis unter anderem durch die Reduktion des Biofilms zu vermeiden ist.

Die chronische Parodontitis ist plaqueinduziert und gleichzeitig die häufigste Form aller Parodontalerkrankungen. (Armitage 1999).

- Die aggressive Parodontitis ist durch einen raschen Attachment- und Knochenverlust bei ansonsten klinisch gesunden Patienten, jedoch mit häufiger familiärer Disposition gekennzeichnet. Andere Merkmale können bei einem großen Teil der Patienten beobachtet werden. So korreliert oft die Menge der bakteriellen Beläge nicht mit der Schwere der parodontalen Gewebsdestrukti-

on. Erhöhte Anteile von *A. actinomycetemcomitans* und zum Teil auch *P. gingivalis* werden in der subgingivalen Mikroflora gefunden. Darüber hinaus werden Funktionsstörungen der neutrophilen Granulozyten beziehungsweise eine überschießende Makrophagenaktivität und eine Selbstlimitation des Attachment- und Knochenverlustes beschrieben (Dannewitz und Eickholz 2004). Bei der aggressiven Parodontitis sind vermehrt jüngere Patienten betroffen.

Beide Krankheitsbilder können durch vertikalen und horizontalen Knochenabbau gekennzeichnet sein.

2.2 Parodontopathogene Mikroorganismen

Entstehung und Progression parodontaler Entzündungsprozesse sind in der Regel auf eine Verschiebung des mikrobiellen Keimspektrums in der Mundhöhle, speziell im subgingivalen Bereich zurückzuführen. Während sich bei einem gesunden Parodont die orale Mikroflora vorwiegend aus gram-positiven, fakultativen Anaerobiern zusammensetzt, überwiegen bei einer Parodontitis die gram-negativen Anaerobier. Tatsache ist, dass mit den sogenannten Leitkeimen oft Gruppen weiterer Bakterienspezies assoziiert sind, die ein kompliziertes Netzwerk von Stoffwechselprodukten miteinander verbinden und die erst im Zusammenspiel als „mikrobieller Komplex“ zu einer Erhöhung der Pathogenität führen (Socransky et al. 1998).

Die Grundvoraussetzung für die Adhäsion parodontal schädigender Keime an der Wurzeloberfläche der Zähne bilden der „blaue“ Komplex (Actinomyceten), „gelbe“ Komplex (Streptokokken), „grüne“ Komplex (*Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga* spezies, *A. actinomycetemcomitans* serotype a, *Campylobacter concisus*) und „violette“ Komplex (*Veillonella parvula* und *Actinomyces odontolyticus*). Diese Komplexe gelten in der Parodontologie und oralen Mikrobiologie als Frühbesiedler. Das bedeutendste Keimspektrum für die parodontale Destruktion bilden der „orange“- und „rote“ Komplex. Zum „orange“ Komplex zählen *Fusobacterium* spezies und ssp, *Parvimonas micra* (zuvor *Peptostreptococcus micros*), *Prevotella nigrescens*, *P. intermedia*, *Campylobacter* spezies, *Eubacterium nodatum* und *Streptococcus constellatus*. Der „rote“ Komplex beinhaltet *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *Treponema denticola*. Während die Bakterien des Orangen Komplexes als Brückenspezies fun-

gieren, sind die Bakterien des Roten Komplexes als Spätbesiedler anzusehen (Socransky und Haffajee 2000). Abbildung 1 zeigt vereinfacht die erwähnten Komplexe mit den dazu gehörigen parodontopathogenen Mikroorganismen.

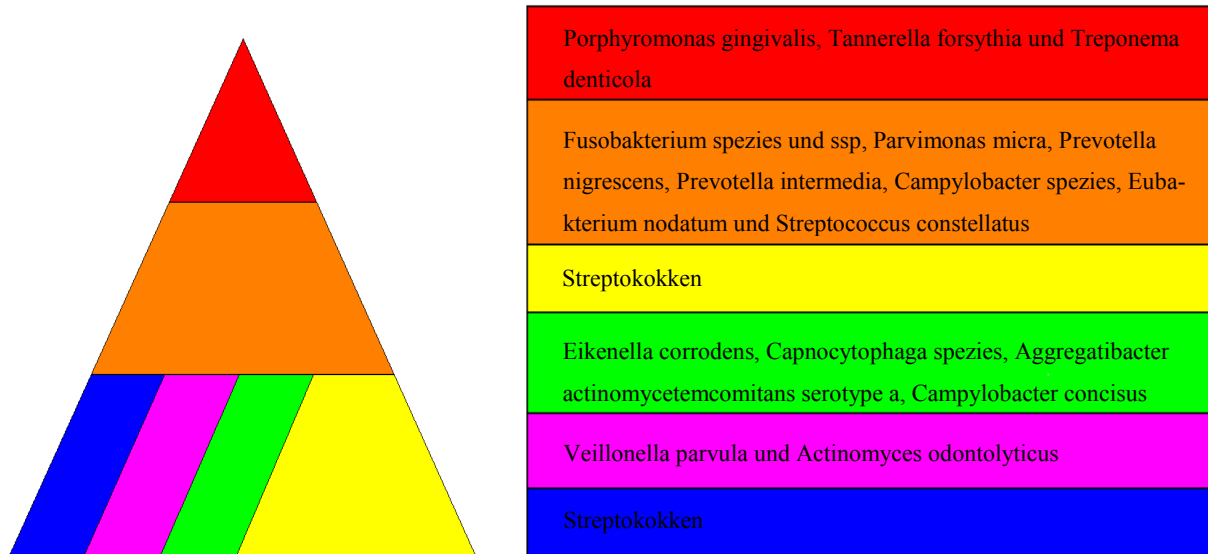


Abbildung 1: Orale Mikroflora

Von den genannten parodontopathogenen Mikroorganismen besitzen einige die Fähigkeit, die Immunantwort des Wirts zu umgehen. Zum Beispiel dringen *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *Fusobacterium nucleatum* in Zellen des parodontalen Gewebes ein (Lamont und Yilmaz 2002). Die von den aufgezählten Mikroorganismen produzierten Toxine wirken zytotoxisch auf Epithelzellen und Fibroblasten. Die lokale Wirtsantwort auf alle diese Bakterien umfasst die Rekrutierung von Leukozyten und die spätere Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Zytokinen im parodontalen Gewebe. Die Folge ist eine exzessive entzündliche Wirtsantwort, die schließlich zur Destruktion der parodontalen Hart- und Weichgewebe führt (Genco et al. 1996, Okada und Murakami 1998).

2.3 Tannerella forsythia

Tannerella forsythia wurde Mitte der 70er Jahre am „Forsyth Institute“ Boston MA/USA isoliert und durch Tanner et al. als „fusiformes Bakterium“ definiert (Tanner et al 1979). Bereits 1986 beschrieb A. Tanner diese Spezies als *B. forsythus*, welche später als *Tannerella forsythensis* (Sakamoto et al. 2002) und letztendlich als *T. forsythia* (Maiden et al. 2003) neu klassifiziert wurde. Dieser parodontopathogene Organismus ist ein gram-negatives, obligat anaerobes, filamentöses Stäbchen. *T.*

T. forsythia gehört dem roten Komplex („A“-Komplex) an und wird im besonderen Maße mit schweren Formen der Parodontitis, besonders die chronische Form in Verbindung gebracht. Zusammen mit *T. denticola* und *P. gingivalis* zählt *T. forsythia* zur Gruppe der Spätbesiedler (Kolenbrander und London 1993). Mitverantwortlich für die Entstehung des Foetor ex ore sind die unangenehm flüchtigen Fettsäuren von *T. forsythia* (Lee et al. 2003). Neben pathologischen Veränderungen des Zahnhalteapparates kann eine Infektion mit *Tannerella forsythia* auch Langzeitfolgen für die systemische Gesundheit haben, wie Herz-Kreislauf Erkrankungen oder Arteriosklerose (Chiu 1999, Desvarieux et al. 2005, Haraszthy et al. 2000, Spahr et al. 2006). Es wurde eine direkte Verknüpfung zwischen entzündlichem Zahnfleisch und einer pathologischen Verdickung der Halsschlagadern nachgewiesen. Derartige Verdickungen, welche durch Ablagerungen an den inneren Gefäßwänden entstehen, sind Vorboten drohender Infarkte oder Schlaganfälle. Von den mehr als 500 bekannten oralen Bakterien wurden vier als besonders gefährlich eingestuft. Dabei handelte es sich um *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola* und auch *T. forsythia*. In dieser Studie konnte eine Korrelation zwischen dem Auftreten der vier erwähnten Bakterien und einer Herz-Kreislauf-Erkrankung bei 657 älteren Männern und Frauen in New York festgestellt werden.

T. forsythia erwies sich als schwer kultivierbar, jedoch wird sein Wachstum durch die Anwesenheit von N-Acetylmuraminsäure stimuliert (Wyss 1989). Die Form der Zellen und Kolonien unterscheiden sich je nach Kultivierungsbedingungen. Zellen einer Kultur, welche auf Agar Nährboden ohne N-Acetylmuraminsäure gezüchtet wurden, erscheinen verhältnismäßig groß, pleomorph, filamentös und mit fusiformen (spindelförmigen) Enden. In Anwesenheit von N-Acetylmuraminsäure erwiesen sich die Kolonien als blass pink, getüpfelt und kreisrund. Die Zellen sind verhältnismäßig klein und regulär geformt (Braham und Moncla 1992). Außerdem wirken Hämin, L-Cystein und Menadion wachstumsstimulierend (Tanner und Izard 2006).

Mit der PCR auf der Basis des 16S rRNA-Gennachweises kann *T. forsythia* bei Parodontitispatienten in einem signifikant höheren Anteil als bei parodontal Gesunden nachgewiesen werden (de Lillo et al. 2004). Während ein Viertel der Jugendlichen dauerhafter Träger von *T. forsythia* ist, beträgt der Anteil bei den Erwachsenen 37%,

eine hohe Keimzahl in den parodontalen Taschen wurde bei 11% der Erwachsenen nachgewiesen (Narayanan et al. 2005).

Die Zellmembran von *T. forsythia* gliedert sich in eine innere-, äußere Membran und die Oberflächenschicht (Oberflächenlayer = S layer = S Schicht). Die kristalline Oberflächenschicht ist ein potenzieller Virulenzfaktor, denn die S-Schicht kann Hämagglutination sowie die Invasion von Epithelzellen vermitteln. *T. forsythia* ist bis jetzt das einzig bekannte gram-negative Bakterium mit solch einer glykosylierten S-Schicht. Diese glykosylierten Zelloberflächenmoleküle sind entscheidend für die Adhäsion von *T. forsythia* an das gingivale Epithel und die Auslösung einer Wirtsimmunantwort (Han et al. 2000 und van Winkelhoff et al. 1988).

Als Virulenzfaktoren werden Strukturelemente und Stoffwechselprodukte von Bakterien bezeichnet, die die krankheitserregenden Eigenschaften einer bestimmten Spezies bedingen. Zur Gruppe der Virulenzfaktoren gehören u.a. Adhäsine, Invasine, Etabline oder andere Schädigungsfaktoren wie z.B. Toxine (Miksits et al. 1992). *T. forsythia* zeichnet sich durch zahlreiche Virulenzfaktoren aus, es konnten hydrolytische und proteolytische Enzyme (Proteasen) nachgewiesen werden (Eley und Cox 2003). Unter anderem zählt Trypsin zu den wichtigsten Faktoren für die Gewebeerstörung bei der Parodontitis (Grenier 1995, Potempa et al. 2000). Ähnlich wie *P. gingivalis* und *T. denticola* hydrolysiert *T. forsythia* Trypsin-ähnliche Benzyl-DL-Arginine-2-naphthyl-Amide („BANA“) (Loesche 1986). Eine Cysteinprotease, kodiert auf dem prTH-Gen von *T. forsythia* und mit einem Molekulargewicht von 48-kDA, scheint eine besondere Rolle in der Pathogenese der Parodontitis zu spielen. Sie zeichnet sich durch proteolytische sowie auch hydrolytische Aktivität aus (Tan et al. 2001).

Durch eine große Zahl von Virulenzfaktoren ist *Tannerella forsythia* stark gewebeinvasiv, parodontopathogen und bringt eine große Rezidivgefahr mit sich. Es besteht eine hohe Korrelation zwischen Taschentiefe und Blutungsindex (BOP) mit dem Auftreten von *T. forsythia* (Socransky et al. 1998).

Ziel der Parodontitistherapie ist, das Fortschreiten der Ausbildung von Krankheitssymptomen wie Blutung nach Sondierung, Attachmentverlusten, Zahnlockerungen

und den Verlust von Zähnen zu verhindern, um eine Regeneration des Parodontalgewebes zu erreichen (Page 1993, Page und Beck 1997). Da die subgingivale Plaque mit ihren Mikroorganismen als Hauptauslöser von Parodontitiden angesehen wird, sollte der erste Schritt einer Therapie in der quantitativen Reduktion oder möglichst Elimination dieser bestehen (Axelsson et al. 1991, Quirynen et al. 1991).

Die geschlossene Kürettage, maschinell oder handinstrumentell betrieben, gilt bis heute als Standardverfahren zur Reinigung der Wurzeloberflächen und Entfernung des Taschenepithels (Preshaw et al. 2004). Durch alleinige Kürettage der Wurzeloberflächen lassen sich die meisten Mikroorganismen wie *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* oder *T. forsythia* in ihrer Anzahl nur schwer reduzieren. Um die Zahl dieser parodontopathogenen Keime über die Wirkung des mechanischen supra- und subgingivalen Debridements hinaus zu reduzieren und wenn möglich zu eliminieren, wird deshalb bei Parodontitisformen wie *A. actinomycetemcomitans*-assoziierten aggressiven Parodontitiden oder rekurrierenden Formen chronischer Parodontitiden die unterstützende Verabreichung von Antibiotika empfohlen (Walker und Karpinia 2002, Addy und Martin 2003, Dörfer 2003, Etienne 2003).

Bei der Gabe von Antibiotika besteht immer die Gefahr der Resistenzentwicklung, somit sollte eine mikrobiologische Diagnostik erfolgen, um die wichtigen Markerkeime zu bestimmen. Laut DGZMK ist die Antibiotikagabe bei aggressiver- und schwerer chronischer Parodontitis, nekrotisierender Gingivitis und bei Parodontalabszessen ratsam (Beikler et al. 2003).

Aufgrund der Gewebeinvasivität von *T. forsythia* ist auch hier das SRP (Scaling and Root Planing) oft nicht ausreichend. Adjuvant wird die Gabe von Metronidazol als Therapie empfohlen. Bei Unverträglichkeit oder Resistenz sollten Clindamycin oder Doxycyclin verabreicht werden (Flemmig und Karch 2003).

3 Zielstellung

Ziel der Arbeit war es zunächst, eine Vielzahl von subgingivalen Plaqueproben auf das Vorhandensein der Bakterienspezies *T. forsythia* zu testen.

Der Hauptteil der Studie bestand darin, aus einem Pool von Proben, die von Patienten mit chronischer- und aggressiver Parodontitis stammten, mittels PCR *T. forsythia* nachzuweisen. Die positiv getesteten Proben sollten anschließend auf das Vorhandensein von diversen Proteasen dieses parodontopathogenen Mikroorganismus getestet werden. Außerdem sollte verglichen werden, ob Unterschiede in der Prävalenz einzelner Proteasen im Hinblick auf chronische- und aggressive Parodontitis existieren.

Da der rote Komplex, und somit *T. forsythia* eine erhöhte Assoziation auf Taschentiefe und Bleeding on probing (BOP) zeigt, wurden in einem weiteren Teilversuch subgingivale Plaqueproben aus unterschiedlich tiefen Taschen entnommen und mittels PCR auf das quantitative Vorkommen von *T. forsythia* und anderer parodontopathogener Mikroorganismen untersucht.

Im letzten Teil der Studie sollte überprüft werden, ob Proteasen im gingivalen Sulkus vorhanden sind. Zu diesem Zweck wurde die mRNA Expression von Proteasengenomen bestimmt. Dieser Teilversuch wurde mit vier Proteasen durchgeführt.

4 Methodik

4.1 Konventionelle PCR

4.1.1 Patientenproben

Am Anfang der Studie stand die Akquirierung von verwertbaren, klinischen Proben im Vordergrund. Nach Bewilligung des Ethikantrages und einer ausführlichen Patientenaufklärung erfolgte die Entnahme der Proben mittels endodontischen Papierspitzen. Diese wurden randomisiert aus parodontalen Taschen (> 3 mm Sondierungstiefe) entnommen. Dabei verblieben die Papierspitzen für ca. 30 Sekunden im Sulkus. Anschließend kamen die Proben auf direktem Weg via Eppendorf®-Tube ins Labor zur DNA-Extraktion.

4.1.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde mit dem „Genomic Mini“®-Set (HELICONIUS, A&A BIOTECHNOLOGY, Poland) durchgeführt. Die Versuchsdurchführung erfolgte exakt nach Protokoll.

Anfertigen der Bakteriensuspension

Die mit Bakterien behaftete Papierspitze wurde im Eppendorf®-Tube mit 100 µl Tris-Puffer (TrisHCl pH 8,5), 200 µl Lysepuffer und 20 µl Proteinase K versetzt. Die Proteinase K (gehört zur Familie der subtilisin-ähnlichen Serinproteasen und besitzt endo- und exoproteolytische Aktivität) erfüllt den Zweck, Proteine in Zelllysaten abzubauen und die Bakterienhülle zu spalten, um auf diesem Weg die DNA freizusetzen.

Es erfolgte das Mischen mittels Vortex der Suspension für ca. 20 Sekunden, um eine sichtbare Homogenisierung der Bakterien zu erreichen und die anschließende Inkubation bei 37°C für 20 Minuten. Danach wurde die Lösung für ca. 5 Minuten bei 70°C inkubiert, um die Aktivität der Proteasen durch Denaturierung zu stoppen. Das Vortexen der Suspension wurde nochmals für 20 Sekunden durchgeführt.

Isolation der DNA

Um feste Bestandteile (Zellüberreste) aus der Suspension zu entfernen, wurden diese für zwei Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde über den Filter des „spin column“ (=Spinsäule, Eppendorff-Tube mit abnehmbaren Filter, Abbildung 2) gegeben. Es folgte eine erneute Zentrifugation für eine Minute bei gleicher Umdrehungszahl. Die DNA bindet an der Membran des Filters, sodass die Flüssigkeit im Tube verworfen werden konnte.

Waschen

Dies ist ein wichtiger Schritt bei der DNA-Isolation, der als Voraussetzung für erfolgreiche Weiterarbeit im Versuchsverlauf mit sauberen Agenzien dient.

Um die im Filter enthaltene DNA „sauber“ zu waschen, wurde zweimalig 400 µl Waschpuffer (Alkohol, der dazu dient, noch enthaltene Proteine zu denaturieren und aus der Membran zu spülen) dazu gegeben und beim ersten Waschvorgang für eine Minute und beim zweiten für zwei Minuten zentrifugiert. Hierbei war wichtig, dass zwischen jedem Schritt das Eppendorf®-Tube gewechselt und die Restflüssigkeit verworfen wurde. Die „spin column“ wurde anschließend auf ein 1,5 ml Eppendorf®-Tube gesetzt und die DNA mittels 100 µl, auf 75°C vorgeheiztem Tris-Puffer aus dem Filter eluiert. Dies geschah durch erneutes Zentrifugieren und eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die extrahierte DNA bei –20°C gelagert.

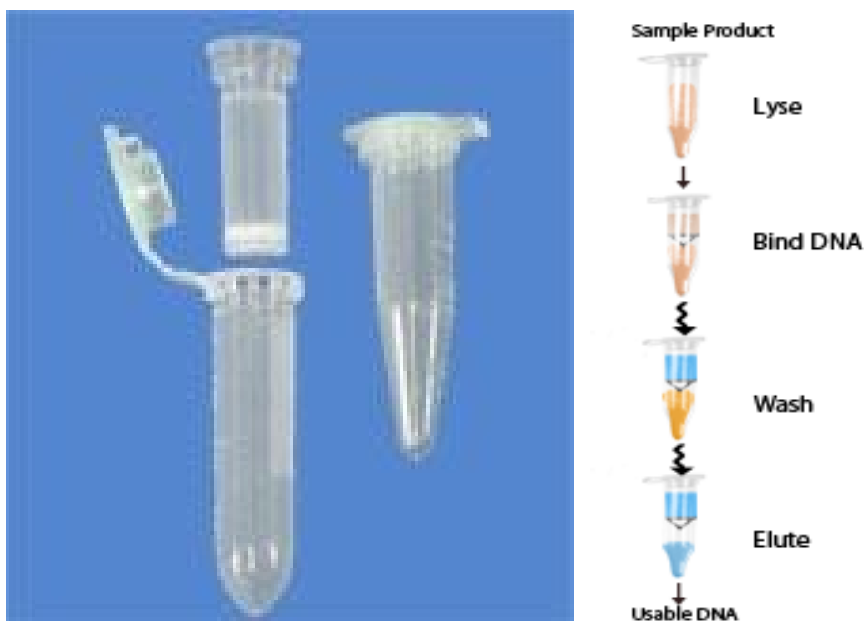


Abbildung 2: DNA-Extraktion mittels Spinsäule

4.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (engl. Polymerase chain reaction) dient in der klinischen Mikrobiologie der Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Sequenz um ein 10 Millionen-faches. Auf diese Art und Weise ist es möglich, den gewünschten DNA-Abschnitt später im Agarsegel sichtbar zu machen. Die Einführung der aus *Thermus aquaticus* isolierten hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase hat das Verfahren aufgrund der wiederholten Einsetzbarkeit von Temperaturen bis 95°C deutlich vereinfacht und beschleunigt, außerdem kann diese Polymerase auch DNA-Abschnitte von mehr als 400 Basenpaaren synthetisieren (Saiki et al. 1988). Zur Versuchsdurchführung wurden neben der bereits angesprochenen Taq DNA-Polymerase auch Primer, Nukleotide, MgCl₂, Taq-Puffer und dH₂O in bestimmter Konzentration zueinander verwendet.

4.1.3.1 Zusammensetzung Mastermix (MM)

Primer

Zur Vorbereitung der konventionellen PCR erfolgte nach ausgiebiger Literaturrecherche die Bestimmung der Primer für die Amplifikation bakterienspezifischer 16S rDNA-Abschnitte. Als geeignet für den qualitativen Bakteriennachweis erwiesen sich die von Ashimoto et al. (1996) definierten Primer für *T. forsythia*.

Der Hinweis auf relevante Proteasen von *T. forsythia* basierte auf persönlichen Mitteilungen von Professor Jan Potempa (Jagiellonen-Universität Krakau). Zur Bestimmung der Primer für den Nachweis der zehn Proteasen wurden DNA-Sequenzen aus der Datenbank von „Oral Pathogene Sequence Databases, Los Alamos National Library/USA“ herangezogen. Unter Zuhilfenahme des Programms Primer 3 erfolgte das Design der jeweiligen Primer.

Tabelle 1: Übersicht verwendeter Primer zum qualitativen Bakteriennachweise mittels konventioneller PCR für *Tannerella forsythia*

Primerpaare (forward and reverse)	Basenposition und Länge des Amplifikats
<i>T. forsythia</i> 60°C ATCC43037 Tf-1: 5'-GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA Tf-2: 5'-TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	
<i>Forsypsin</i> (TF0947): 58°C "Karipsin" fors-1: 5'-GAA AGG GGT CTG TCA TAC GG fors-2: 5'-ACA GCC CGT CAA CGT TTT AG	729-972 (244)
<i>Putative metalloprotease</i> (TF0341): 58°C "Bartolysin" tfmp-1: 5'-CGA ACA TCG ACT TCC ACA GA tfmp-2: 5'-TGT TTT AGG GAA CGA AGG ACA	445-840 (396)
<i>Putative subtilisin-like protease</i> (TF0347): 58°C "Mirolysin" tfslp-1: 5'-TGC CGC AAA TCA TAA TGG TA tfslp-2: 5'-GTC CAT CCC TTC CTT GAG TG	447-739 (293)
<i>Putative serine protease</i> (TF0357): 56°C tfsp-1: 5'-AAG AAG GAG ATA TGC TTT ATG GTC tfsp-2: 5'-TCC GAC TCT TTA CTC CAA ACA G	422-671 (250)
<i>Trypsin-like proteases</i> (TF0364): 56°C tftlp-1: 5'-TCG CAT CGA CTA TGG ATA CAG tftlp-2: 5'-CGG ATT ACT GAT TGC ATC AAA	579-870 (292)
<i>Legumain-like protease</i> (TF0359): 56°C tfllp-1: 5'-TGT TCA GGG AGA ACT TTT TGA tfllp-2: 5'-CGG GGG TCA ATC TGT TTC TT	414-787 (374)
<i>Eukaryotic-like metalloproteinase</i> (TF0367): 56°C "Karilysin" tfemp-1: 5'-GTC TGC GAT CAA GCA ACC T tfemp-2: 5'-TCC ATA TTC TCC TTG AGG TGT C	481-771 (291)
<i>Thermolysin-like protease</i> (TF1715): 58°C tfthp-1: 5'-GGC AAA TTC CGG AAG AAG AG tfthp-2: 5'-AAA ACC TCC ACC GAA CGA AT	473-771 (299)
<i>Trypsin-like proteases b</i> (TF2174): 57°C "Miropsin" tftlb-1: 5'-TCG CAT CGA CTA TGG ATA CAG tftlb-2: 5'-GAT TGC TGA TCG CAT CGA A	579-868 (290)

Taq DNA-Polymerase

Die Taq-Polymerase ist eine hitzebeständige DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, die 1969 erstmals von Thomas Brock und Hudson Freeze isoliert wurde. Dem Enzym kommt eine bedeutende Rolle bei der DNA-Vervielfältigung zu, weil es bei 95,7°C eine Halbwertszeit von 9 Minuten aufweist (Lawyer et al. 1993). Die rekombinante Form dieses Enzyms wird vom *E.coli*-Bakterium als ein 94 kDa Protein exprimiert.

Nukleotide

Nukleotide sind Moleküle, die im genetischen Code als Grundbausteine für DNA und RNA fungieren. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche PCR ist die exakte Konzentration jedes Nukleotids (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) von 200 µM im Mastermix. Konzentrationsungenauigkeiten schon von wenigen Nukleotiden haben negative Auswirkungen auf die Amplifikation.

Magnesiumchlorid

Magnesiumchlorid lag im Set als Lösung in einer Konzentration von 25 mM vor. Magnesium-Ionen sind essentiell für die Funktion der Polymerase und dienen der Optimierung der PCR. Zu wenige Mg^{2+} -Ionen führen zu einer verminderten Zahl an PCR-Produkten, zu viele Mg^{2+} -Ionen steigern die Anzahl unspezifischer DNA-Stränge.

Taq-Puffer

Wie jeder Puffer dient auch dieser zur Aufrechterhaltung des korrekten pH-Wertes von 8,8 bei 25°C, um so eine geeignete chemische Umgebung für die DNA-Polymerase sicherzustellen. Der Taq-Puffer setzt sich aus Wasser (>50%), Kaliumchlorid (2,5-10) und Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (1-2,5%) zusammen (Fermentas Life Science).

4.1.3.2 Durchführung

Um unterschiedliche Reaktionen parallel ablaufen zu lassen, wurde ein Mastermix vorzugsweise in einem Eppendorf-Tube 1,5 ml, welcher Primer, Taq DNA-Polymerase, Nukleotide, $MgCl_2$, Taq-Puffer und dH_2O enthielt, präpariert. Die Menge der eingesetzten Bestandteile richtet sich dabei nach der Probenzahl, wobei ein

Pipettierverlust einberechnet werden muss. Diese Methode ist zeitsparend und minimiert mögliche Pipettierfehler.

Tabelle 2: Mastermixansatz: Beispiel für 12 Patientenproben

Komponente	Volumen (1x)	Finalvolumen (14x)
Primer 1 (forward)	1,25 µl	17,5 µl
Primer 2 (reverse)	1,25 µl	17,5 µl
Taq DNA-Polymerase	1 U	14 U
Nukleotide	2,5 µl	35 µl
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	2,5 µl	35 µl
Taq-Puffer	2,5 µl	35 µl
dH ₂ O	11,5 µl	161 µl
	22,5 µl pro Tube	315 µl Gesamt MM

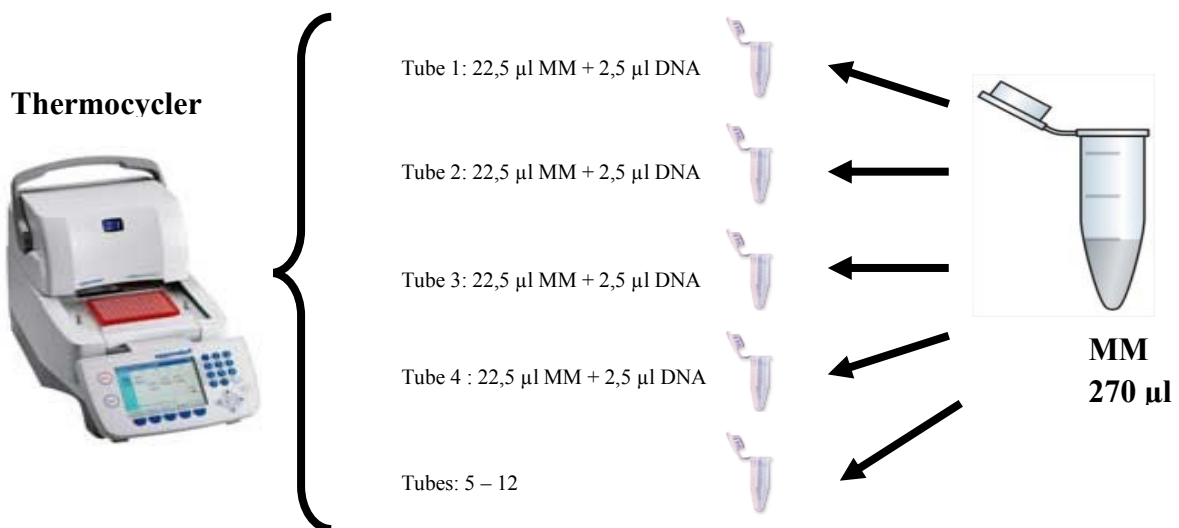


Abbildung 3: Mastermix und Thermocycler

Zur Durchführung der PCR wurden die DNA-Extrakte aufgetaut, vorsichtig gemischt und 2,5 µl Template-DNA entnommen. Die Amplifikation erfolgte im 0,2 ml Tube mit 25 µl Reaktionsvolumen, welches sich aus 2,5 µl Template-DNA und 22,5 µl MM zusammensetzte (Tabelle 2). Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten 22,5 µl Mastermix und 2,5 µl dH₂O anstelle der DNA. Für die Postivkontrolle wurde der Stamm ATCC 43330 verwendet.

Anschließend konnte die konventionelle PCR im Eppendorf Master Cycler EP, (Hamburg-Eppendorf, Deutschland) gemäß folgendem PCR-Protokoll realisiert werden:

Die komplette Denaturierung der Template-DNA beim Start der PCR ist von außerordentlicher Bedeutung. Dies erfolgte in der initialen Denaturierungsphase bei 95°C für zwei Minuten. Es schloss sich die Replikation der DNA in 36 Zyklen an. Am Anfang jedes Zyklus stand die erneute Denaturierung für 30 Sekunden bei 95°C. Es folgte die Primeranlagerung bei 57°C für eine Minute. Wenn die Temperatur auf 72°C angestiegen war, wurde diese für zwei Minuten beibehalten, wobei es zur DNA-Verlängerung mittels Anlagerung der Nukleotide kam. Waren die 36 Zyklen durchlaufen, folgte die Phase der Elongation für 10 Minuten bei 72°C (Abbildung 4).

Die beschriebenen Zeiten und Temperaturen galten für den Nachweis von Trypsin-like proteases b („Miropsin“, tftlb-1 und tftlb-2). Wie in Tabelle 1 vermerkt, gab es zwischen den Annealing Temperaturen der einzelnen Proteasen kleine Abweichungen.

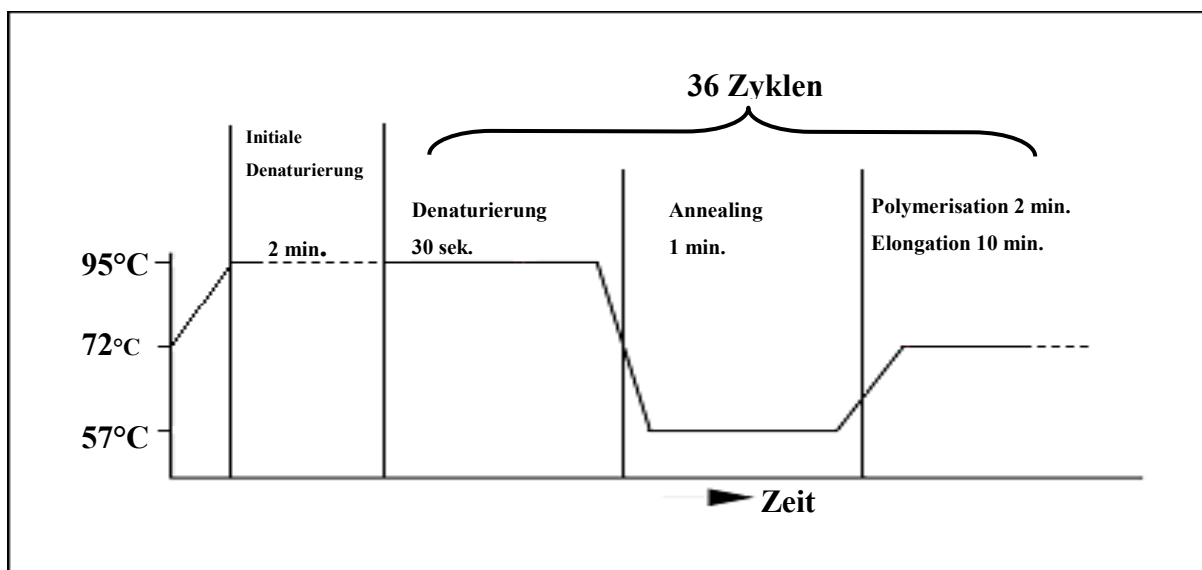


Abbildung 4: Polymerisationszyklen für den Nachweis der Protease Miropsin

4.1.3.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient dem Nachweis der DNA-Amplifikation auf der Grundlage eines zweiprozentigen Agarosegels. Zur Anfertigung des Gels wurden 1,5 g Agarose in 75 ml Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) gelöst und anschließend erhitzt. Um das Amplifikat später im Gel sichtbar zu machen, wurde dieses mit 5 µl des Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I (Bio-Rad, Eugene, Oregon, USA) versetzt. Das noch nicht auspolymerisierte, warme Agarosegel wurde zum Abkühlen und zur Formgebung in eine Gelkammer mit 15 Slots gegossen.

Die Amplifikate wurden dem Thermocycler entnommen. Aus dem Reaktionsvolumen von 25 µl wurden 5 µl in ein separates Eppendorf-Tube gegeben und mit 3 µl Orange G als Laufkontrolle (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, New Jersey, USA) vorsichtig vermischt und in einen Slot eingebracht. Als Kontrolle der amplifizierten DNA-Abschnitte wurde ein DNA Marker mitgeführt, als Laufpuffer diente 0,5facher TBE-Puffer.

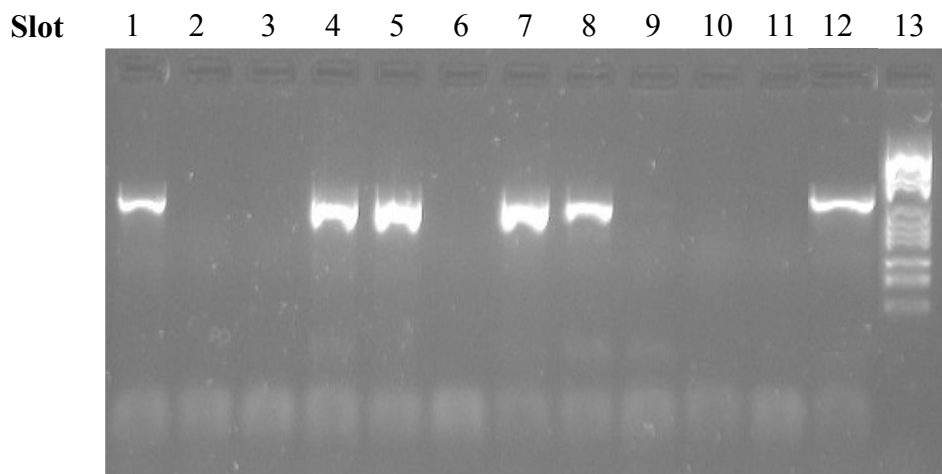


Abbildung 5: Agarosegel unter UV-Transilluminator

T. forsythia positive Patienten	→ 1; 4; 5; 7; 8
T. forsythia negative Patienten	→ 2; 3; 6; 9; 10
Negativkontrolle	→ 11
Positivkontrolle	→ 12
Marker	→ 13

In der Elektrophoresekammer lief das Gel für ca. 40 Minuten bei 120 V. Nach erfolgter Auftrennung der Amplifikate wurde das Gel unter einem UV-Transilluminator betrachtet und fotografiert (Abbildung 5). Die qualitative Auswertung erfolgte anhand des Vergleiches der Positivkontrolle mit den Patientenproben. Die Patientenproben galten als positiv, wenn die Position der spezifischen DNA-Banden mit der Position der Bande der Positivkontrolle korrelierte und im Molekulargewicht mit dem Marker übereinstimmte. Im Falle einer undeutlichen, schwachen Bande, wurde die PCR wiederholt. Nur eindeutige Banden wurden als positiv interpretiert.

4.2 Nachweis von parodontopathogenen Bakterien mittels micro-Ident® Test

Der micro-IDent® Test beruht auf der DNA-STRIP®-Technologie und erlaubt die gemeinsame molekulargenetische Identifizierung der fünf parodontopathogenen Bakterien-Spezies *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* und *T. denticola* (Hain Lifescience 2004).

Der gesamte Testablauf unterteilte sich in folgende drei Abschnitte: DNA-Isolierung aus subgingivalen Plaqueproben (entnommen mit Papierspitzen; ein hierzu benötigter DNA-Isolierungskit ist nicht Bestandteil des Kits), Multiplex-Amplifikation mit Biotin-markierten Primern (eine hierzu benötigte thermostabile DNA-Polymerase ist nicht Bestandteil des Kits) und reverse Hybridisierung.

4.2.1 Probengewinnung und DNA-Isolierung

Dieser Teilversuch wurde mit subgingivalen Plaqueproben von insgesamt zehn Probanden durchgeführt. Jedem Probanden entnahmen wir drei Papierspitzen aus unterschiedlich tiefen parodontalen Taschen. Die Taschentiefen waren bei „a“ zwei Millimeter, „b“ vier Millimeter und „c“ sechs Millimeter. Die Isolation der Bakterien DNA erfolgte mittels QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen, Hilden). Die Papierspitzen wurden mit 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend folgte die Hinzugabe von 200 µl Lysispuffer A1 und eine erneute Inkubation bei 95°C. Der Ansatz (ohne Filterspitzen) wurde auf einer Säule (QIAamp Spin Column) pipettiert und zweimal mit dem Puffer AW1 und AW2 gewaschen. Die DNA wurde in 400 µl AE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

4.2.2 Multiplex-Amplifikation (PCR)

Für die spezifische Amplifikation von *A. actinomycetemcomitans* (A.a.), *P. gingivalis* (P.g.), *P. intermedia* (P.i.), *T. forsythia* (T.f.) und *T. denticola* (T.d.) wurde der micro-Ident® Test von HAIN-Diagnostik (Lifesience, Nehren) benutzt. Der Mastermix (bestehend aus Puffer, biotinylierten Primern und DNA als Positivkontrolle) wurde mit 2U Taq-Polymerase (Eppendorff, Hamburg) und 5 µl der isolierten bakteriellen DNA gemixt. Die PCR gliederte sich wie folgt:

- 1.) Initiale Denaturierung: 5 min. bei 95°C
- 2.) 10 Zyklen: Denaturierung für 30 sek. bei 95°C, Annealing für 2 min. bei 58°C
- 3.) 20 Zyklen: Denaturierung für 25 sek. bei 95°C, Annealing für 40 sek. bei 53°C, Polymerisation für 40 sek. bei 70°C
- 4.) Elongation für 8 min. bei 70°C

4.2.3 Hybridisierung

Im ersten Schritt der Hybridisierung stand die chemische Denaturierung der Amplifikationsprodukte, da die Detektion auf dem DNA-STRIP® anhand einzelsträngiger DNA erfolgte. Dabei wurden 20 µl des PCR-Produkts und 20 µl der Denaturierungslösung für 5 Minuten inkubiert und anschließend mit 1 ml Hybridisierungspuffer (vorgewärmt auf 45°C) versehen. Die selektiv amplifizierten Nukleinsäuren dieser Lösung wurden im Verlauf der Hybridisierung an die dazu komplementären hochspezifischen Sonden des DNA-STRIP® gebunden. Die Inkubation im Schüttelwasserbad erfolgte bei 45°C für 30 Minuten. Alle unspezifisch gebundenen Amplifikate wurden in diesem Waschschrift entfernt. Anschließend erfolgte nochmals die Waschung der Membran mit 1 ml „stringent wash solution“ bei 45°C für 15 Minuten. Das spezifisch gebundene Amplifikat reagiert während der Konjugat-Reaktion mit 1 ml der Konjugatlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Konjugatlösung beinhaltet das Enzym Streptavidin/Alkalische Phosphatase (AP). Nach nochmaligem Waschen der Membran und Inkubation mit 1ml der Substratlösung erfolgte der visuelle Nachweis der Bakterien durch eine von Alkalischer Phosphatase vermittelten Farbreaktion (Hain Life Science, Deutschland).

4.2.4 Auswertung des DNA-STRIP®

Der micro-Ident® Test wurde nach dem Muster in Abbildung 6 ausgewertet. Alle 30 Teststreifen wurden mittels einer Schablone verglichen und die Konzentrationen visuell bestimmt. Je nach Bandenintensität reichten die Ergebnisse von „Keimkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze“ bis „sehr stark erhöhte Keimkonzentration“. Wie im angeführten Beispiel des Teststreifen 2a hat jeder der fünf Parodontitiseime ein spezielles Areal, in dem die Bande nach Farbreaktion sichtbar werden sollte. Ebenso im Teststreifen enthalten sind zwei Positivkontrollen für die PCR (AC) und die anschließende Hybridisierung (CC).


Teststreifen 2a	Schablone	Auswertung
	→ Conjugate Control (CC)	
	→ Amplification Control (AC)	
	→ Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa)	-
	→ Porphyromonas gingivalis (Pg)	+++
	→ Prevotella intermedia (Pi)	+
	→ Tannerella forsythia (Tf)	++
	→ Treponema denticola (Td)	+

Abbildung 6: Zuordnung von Teststreifen 2a zur Schablone

4.3 mRNA Expression von Proteasen Genen

Im letzten Teilversuch wurden von Parodontitispatienten, bei denen durch konventionelle PCR bereits *T. forsythia* nachgewiesen werden konnte, mittels der Waschmethode subgingivale Plaque Proben aus den jeweils tiefsten parodontalen Taschen jedes Quadranten entnommen. Dies erfolgte mittels fünfmaligem Waschen mit jeweils 15 µl isotonischer Kochsalzlösung. Die Waschlösung (75µl) wurde unmittelbar danach bei -20°C gelagert und im Labor weiter bearbeitet.

4.3.1 Isolation von RNA (mRNA Extraktion)

Die mRNA Extraktion wurde mittels dem RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen/Hilden Germany (Auflage April 2006) exakt nach Handbuch durchgeführt. Es wurde beabsichtigt, die Gesamt RNA zu isolieren.

Vorbereitung

Um die Zellverbände und Gewebereste aus der Papierspitze herauszulösen und sie in eine homogene Suspension zu überführen, bedurfte es einem speziellen Puffer. Hierbei handelte es sich um einen RLT-Puffer. Unter Zugabe von β-Mercaptoethanol (10 µl β-Merkaptoethanol pro 1 ml RLT Puffer) wurden Disulfidbrücken zu freien Thiolen reduziert. Dadurch kam es zum Aufschließen (Lyse) der Proben, um ein einwandfreies Fortfahren des Versuchs zu gewährleisten. Der RLT-Puffer ist ein stark denaturierender Guanidin-Isothiocyanathaltiger Puffer, welcher sofort alle RNAsen inaktiviert.

Ablauf

Die Probe wurde weiter durch den Lysis -Puffer homogenisiert, danach bei maximaler Drehzahl für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetragen und in einem Tube mit 350 µl 70%igem Ethanol versehen, um angemessene Bindungsbedingungen einzustellen. Ethanol fördert die selektive Bindung der RNA an die Membran. Die Probe wurde auf die RNeasy Spinsäule aufgetragen und für 15 Sekunden bei 10.000 U/min. zentrifugiert. Die RNeasy Spinsäule hat die Aufgabe, die gesamte RNA an einer Membran zu binden. Der Durchlauf wurde verworfen. Danach folgten jeweils drei Waschungen der Filtermembran (mittels RPE-Puffer) und Zentrifugationen (mindestens 10.000 U/min), um Kontaminationen zu entfernen. Die Spinsäule wurde letztlich auf ein neues 1,5 ml Eppendorfftube platziert und mit 50 µl

RNase freiem Wasser durchspült. Nach finaler Zentrifugation für eine Minuten war die RNA Extraktion abgeschlossen und die gebrauchsfertige RNA lag als Eluat vor. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

4.3.2 Reverse Transkriptase

Vor der Durchführung einer konventionellen PCR musste in einem ersten Schritt die gewonnene RNA (durch RNeasy Kit) in eine cDNA transkribiert werden (c steht für komplementär). Die folgende Durchführung wurde für sechs Proben erläutert.

Vorbereitungen

Die im ersten Schritt gewonnene Template RNA (Einsatz 1 µg) wurde auf Eis gelagert, gleichzeitig 10x Puffer, dNTP-Mix, RNase-freies Wasser bei Raumtemperatur aufgetaut und auch auf Eis aufbewahrt. Der RNase Inhibitor (1,5 µl, 40 Einheiten/µl) wurde mit 3,5 µl RNase freiem Wasser angesetzt. Die Oligo dT Primer mussten zuvor 1:4 mit RNase freiem Wasser verdünnt werden, d.h. zu 120 µl Oligo dT Primer wurde 480 µl RNase freies Wasser zugegeben.

Mastermix

Der Mastermix bestand aus 12 µl 10x Puffer, 12 µl dNTP-Mix, 6 µl Oligo dT Primer, 12 µl RNase Inhibitor, 6 µl Omniscript Reverse Transkriptase und 60 µl RNase freiem Wasser. Es ergab sich ein Gesamtvolumen aus 108 µl. Jeweils 18 µl Mastermix und 2 µl template RNA wurden vermischt und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte fotometrisch mit dem UV-Spektrometer Genesys 6 (ThermoSpectronic). Die RNA-Proben wurden 1:50 mit Aqua bidest verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (A₂₆₀) und 280 nm (A₂₈₀) bestimmt. Eine A₂₆₀ Einheit (1U) entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg RNA/ml. Die Berechnung der RNA Konzentration erfolgt nach folgender Formel: RNA Konzentration der Probe in µg/µl = (A₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 40 µg/ml)/1000.

4.3.3 Polymerase Kettenreaktion

Mittels der gewonnenen cDNA war es nun möglich, durch eine konventionelle PCR ausgewählte Proteasen von *T. forsythia* nachzuweisen. Dabei handelte es sich um Bartolysin (TF0341) 58°C, Mirolysin (TF0347) 58°C, Karilysin (TF0367) 56°C und Miropsin (TF2174). Die mittels Reverser Transkriptase erzeugte cDNA wurde als Template verwendet. Die PCR und anschließende Gelelektrophorese wurde wie bereits zuvor beschrieben für die relevanten Proteasen durchgeführt. Abbildung 7 zeigt nochmals vereinfacht die Vorgehensweise dieser Studie.

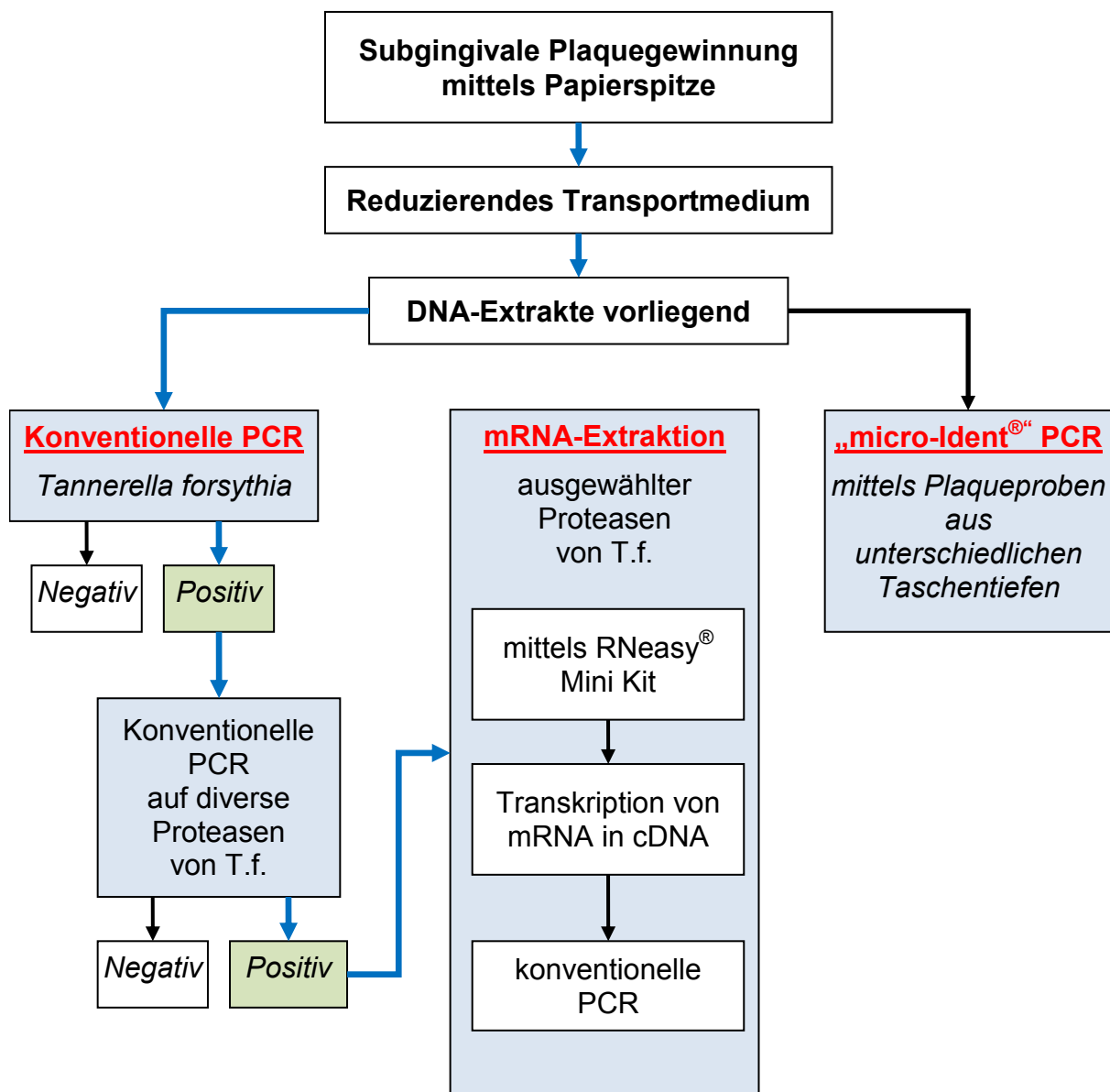


Abbildung 7: Konventionelle PCR, micro-Ident®-PCR und mRNA-Extraktion

5 Ergebnisse

5.1 PCR

5.1.1 Nachweis von *Tannerella forsythia*

Im Hauptteil der Studie wurde ein Kollektiv von 68 Patienten auf das qualitative Vorkommen des hoch parodontopathogenen Bakterium *T. forsythia* untersucht. Das Kollektiv bestand aus 43 Patienten mit chronischer Parodontitis, 19 Patienten mit aggressiver Parodontitis und aus sechs parodontal gesunden Patienten.

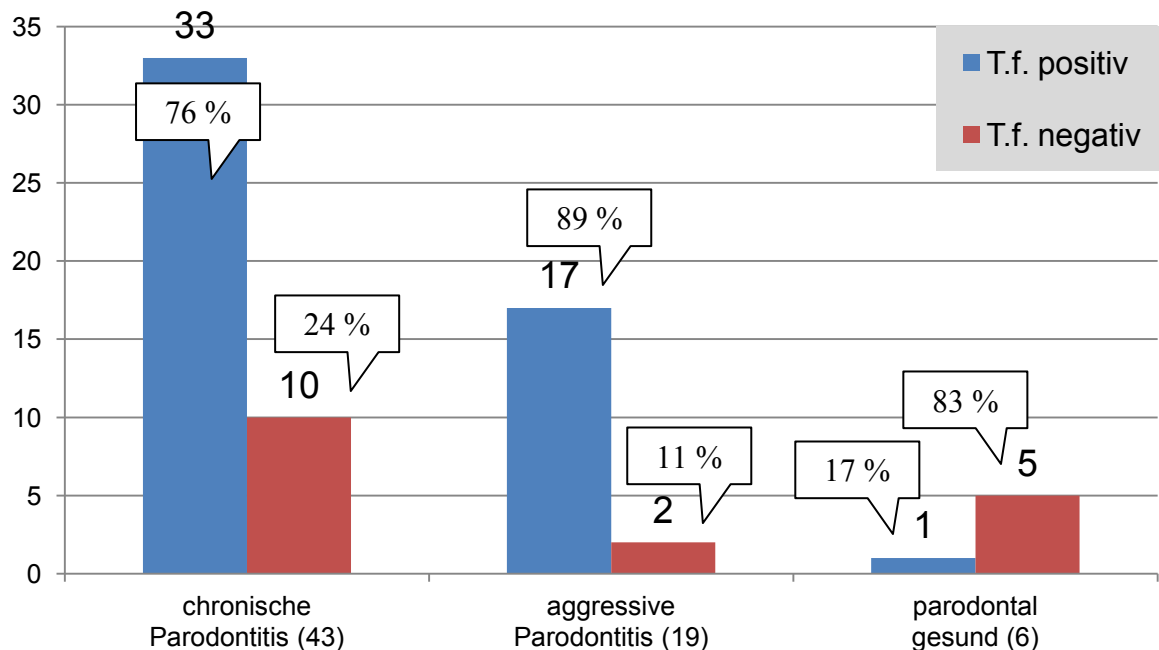


Abbildung 8: PCR-Ergebnisse auf den Stamm von *T. forsythia*

Bei Patienten mit chronischer Parodontitis (n=43) wurde in 33 Proben *T. forsythia* identifiziert. Als „*T. forsythia* negativ“ erwiesen sich 10 Patienten. Beim Patientenkollektiv der aggressiven Parodontitis (n=19) wurden 17 als „*T. forsythia* positiv“ und zwei als „*T. forsythia* negativ“ detektiert. Von den parodontal gesunden Personen (n=6) erwies sich ein Proband als Träger von *T. forsythia*, bei den anderen fünf wurde hingegen diese Bakterienspezies nicht nachgewiesen (Abbildung 8).

5.1.2 Nachweis der Proteasen

Für den weiteren Versuchsverlauf wurden die bereits „T. forsythia positiv“ getesteten Patientenproben verwendet, um die Anzahl und das Vorhandensein einzelner Proteasen herauszufinden. Dabei wurden 28 Patientenproben mit chronischer Parodontitis, 15 Patientenproben mit aggressiver Parodontitis und die einzige „T. forsythia positiv“ Probe von einem parodontal gesunden Patienten zur Weiterarbeit herangezogen.

5.1.2.1 Karipsin

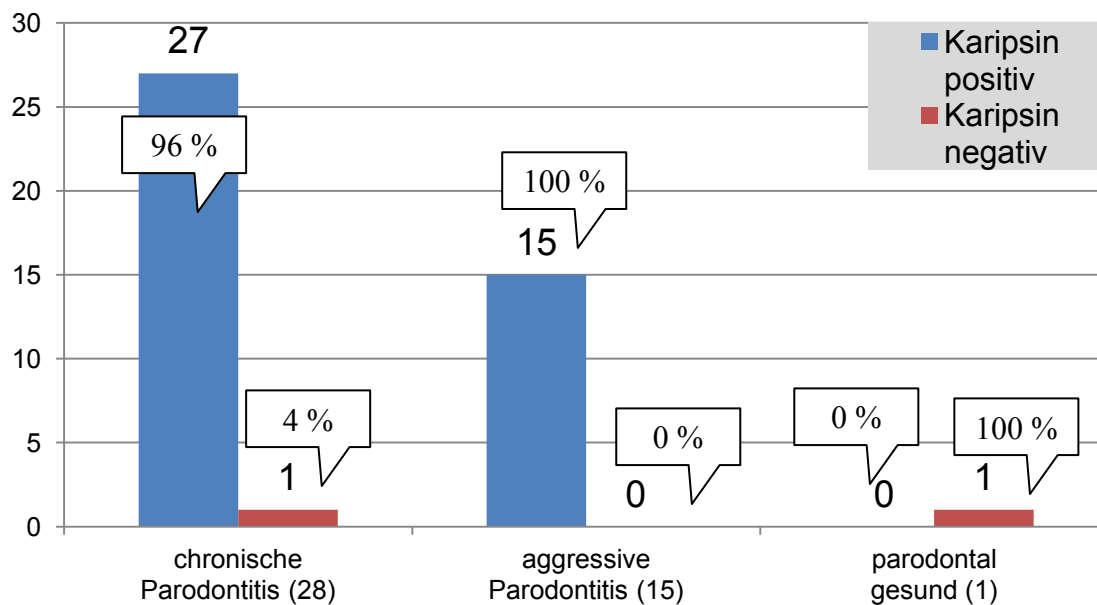


Abbildung 9: PCR-Ergebnisse für die Protease Karipsin

Bei Patienten mit chronischer Parodontitis (n=28) konnte in 27 Proben Karipsin nachgewiesen werden, eine Probe erwies sich als „Karipsin negativ“. Beim Patientenkollektiv der aggressiven Parodontitis (n=15) konnte in jeder Probe Karipsin nachgewiesen werden. Die parodontal gesunde Patientenprobe erwies sich als „Karipsin negativ“ (Abbildung 9).

5.1.2.2 Bartolysin

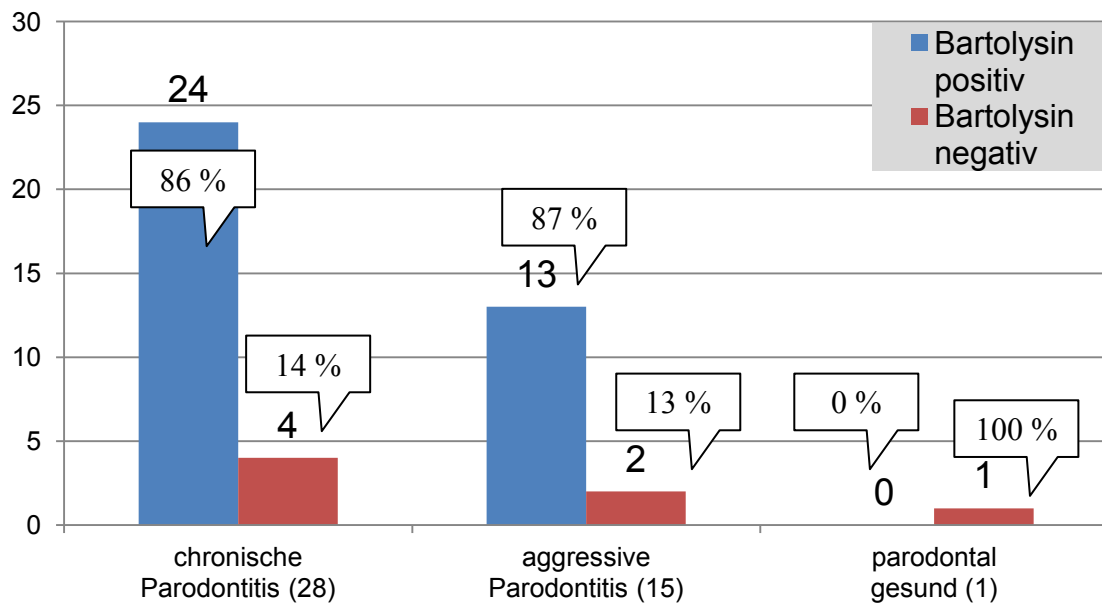


Abbildung 10: PCR-Ergebnisse für die Protease Bartolysin

Beim Patientenkollektiv der chronischen Parodontitis (n=28) konnten 24 Proben als „Bartolysin positiv“ und vier Proben als „Bartolysin negativ“ detektiert werden. Ähnliche Ergebnisse verzeichneten das Patientenkollektiv der aggressiven Parodontitis (n=15), mit 13 Proben „Bartolysin positiv“ und zwei „Bartolysin negativ“. Die parodontal gesunde Patientenprobe erwies sich ebenso als „Bartolysin negativ“ (Abbildung 10).

5.1.2.3 Mirolysin (Putative subtilisin-like protease)

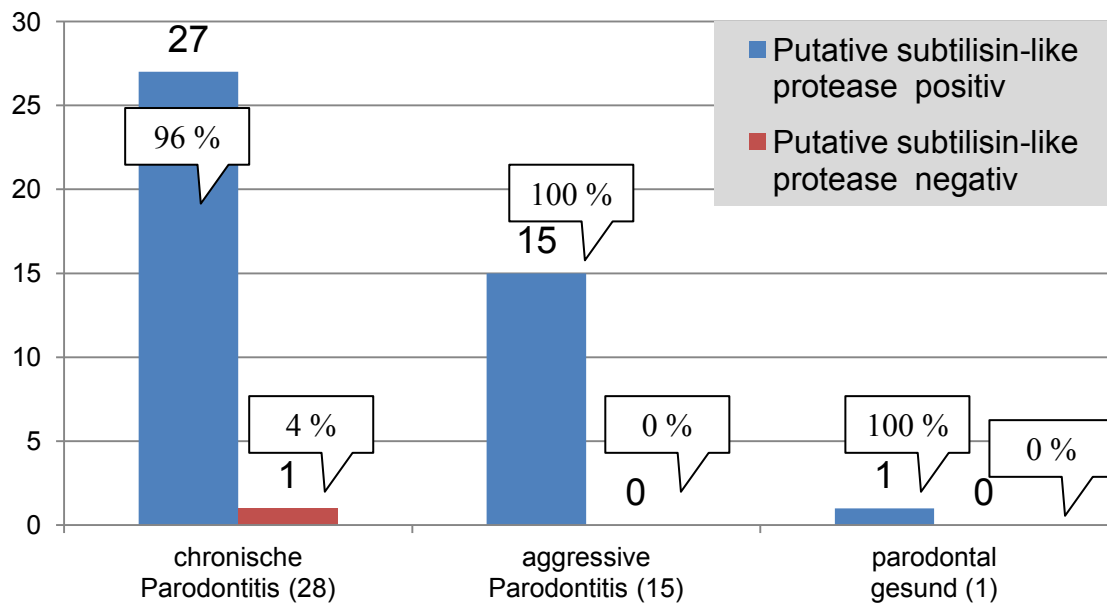


Abbildung 11: PCR-Ergebnisse für Mirolysin

Das Patientenkollektiv der chronischen Parodontitis (n=28) verzeichnete 27 Proben als „Mirolysin positiv“ und eine Probe als „Mirolysin negativ“. Bei der Gruppe der aggressiven Parodontitis (n=15) als auch beim parodontal gesunden Proband (n=1) erwiesen sich alle Patientenproben als „Mirolysin positiv“, keine als „Mirolysin negativ“ (Abbildung 11). Die sehr hohe Prävalenz von Mirolysin wird anschließend nochmals im Agarosegel unter dem UV-Transilluminator verdeutlicht (Abbildung 12). Hierbei sind 25 Patientenproben mit stark positiven Banden sowie eine Negativkontrolle, eine Positivkontrolle und der Marker eindeutig zu erkennen.

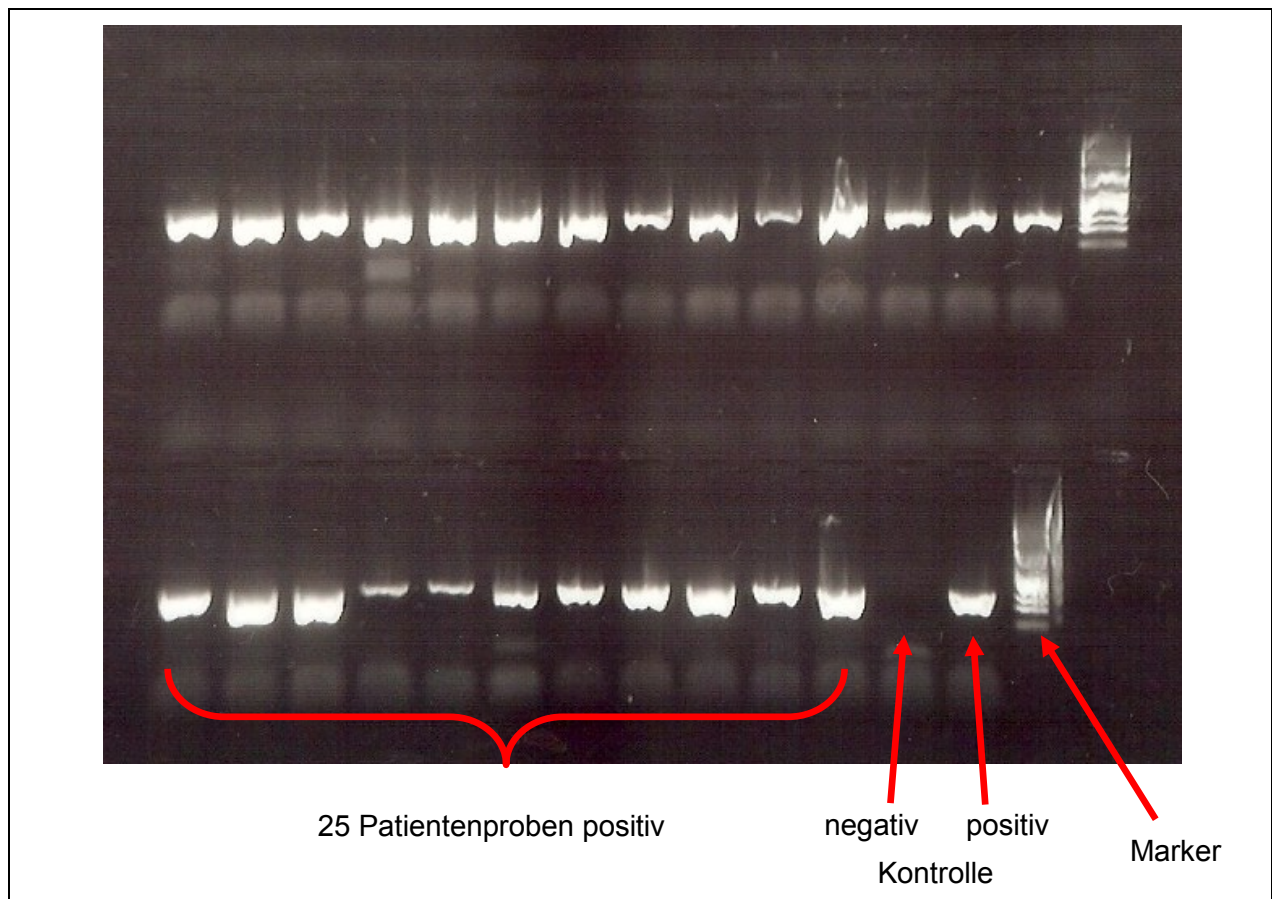


Abbildung 12: Agarosegel von Mirolysin unter UV-Transilluminator

5.1.2.4 Putative serine protease

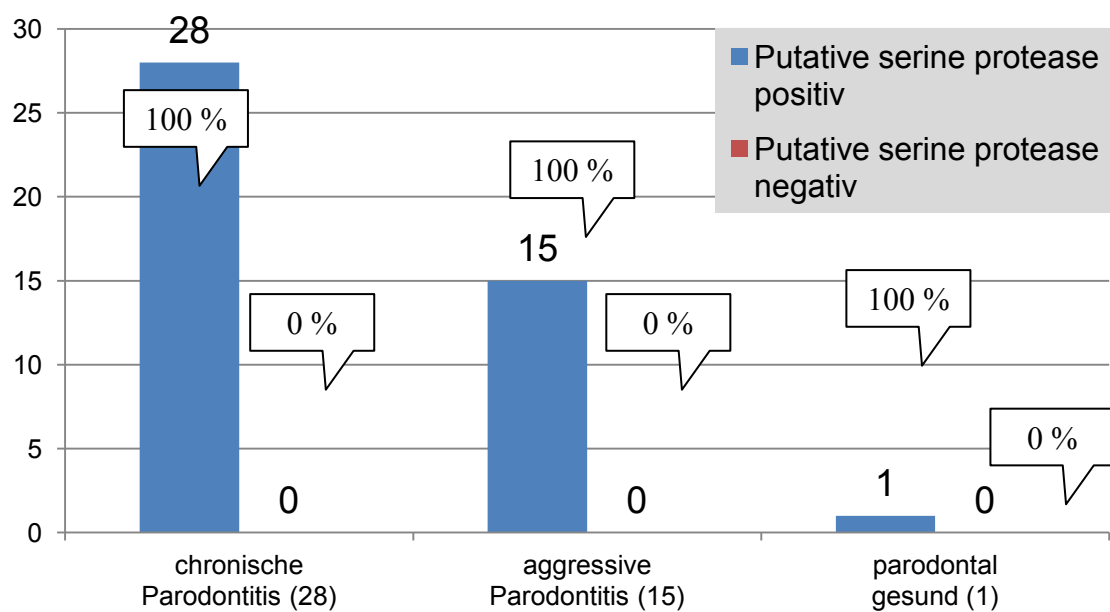


Abbildung 13: PCR-Ergebnisse für die Putative serine protease

Allen 44 „T. forsythia positiven“ Patientenproben (28 Probanden mit chronischer Parodontitis, 15 Patienten mit aggressiver Parodontitis und ein parodontal gesunder Proband) konnte das Vorhandensein der „Putative serine protease“ nachgewiesen werden. Keine Patientenprobe erwies sich als „Putative serine protease negativ“ (Abbildung 13).

5.1.2.5 Trypsin-like protease

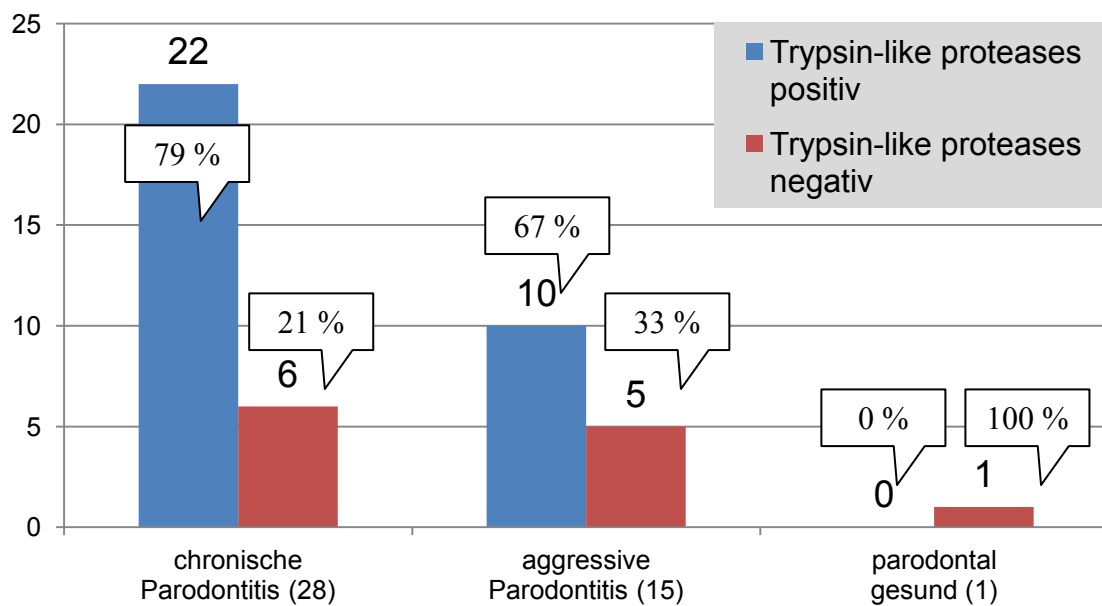


Abbildung 14: PCR-Ergebnisse für die Trypsin-like protease

Beim Kollektiv der chronischen Parodontitis Patienten (n=28) konnte in 22 Proben die „Trypsin-like proteases“ nachgewiesen werden, sechs Proben waren negativ auf die „Trypsin like proteases“. Von 15 Probanden mit aggressiver Parodontitis erwiesen sich 10 als „Trypsin like proteases positiv“ und fünf als „Trypsin like proteases negativ“. Ebenso konnte in der einen parodontal gesunden Patientenprobe keine „Trypsin like proteases“ nachgewiesen werden (Abbildung 14).

5.1.2.6 Legumain-like protease

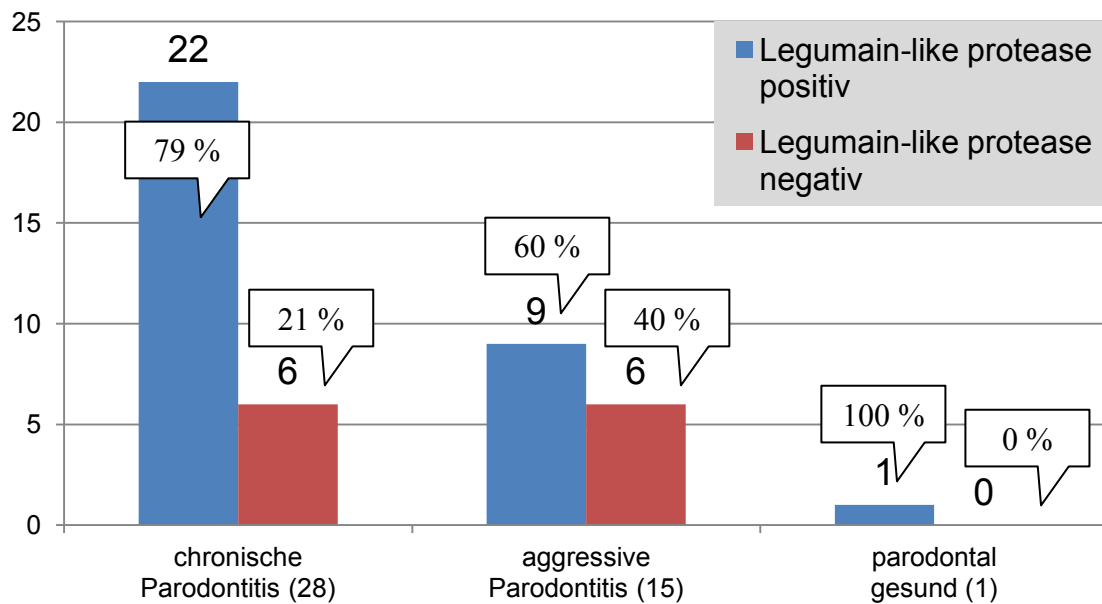


Abbildung 15: PCR-Ergebnisse für die Legumain-like protease

Dem Patientenkollektiv mit chronischer Parodontitis (n=28) konnte in 22 Proben das Vorhandensein der „Legumain-like protease“ nachgewiesen werden, sechs Proben waren „Legumain-like protease negativ“. Deutlich seltener war die „Legumain-like protease“ mit neun positiven Proben von Probanden mit aggressiver Parodontitis (n=15). Somit waren sechs Proben „Legumain-like protease negativ“. In der einzigen Patientenprobe eines parodontal gesunden Patienten, in welcher *T. forsythia* nachgewiesen wurde, konnte auch die „Legumain-like protease“ registriert werden (Abbildung 15).

5.1.2.7 Karilysin (Eukaryotic-like metalloproteinase)

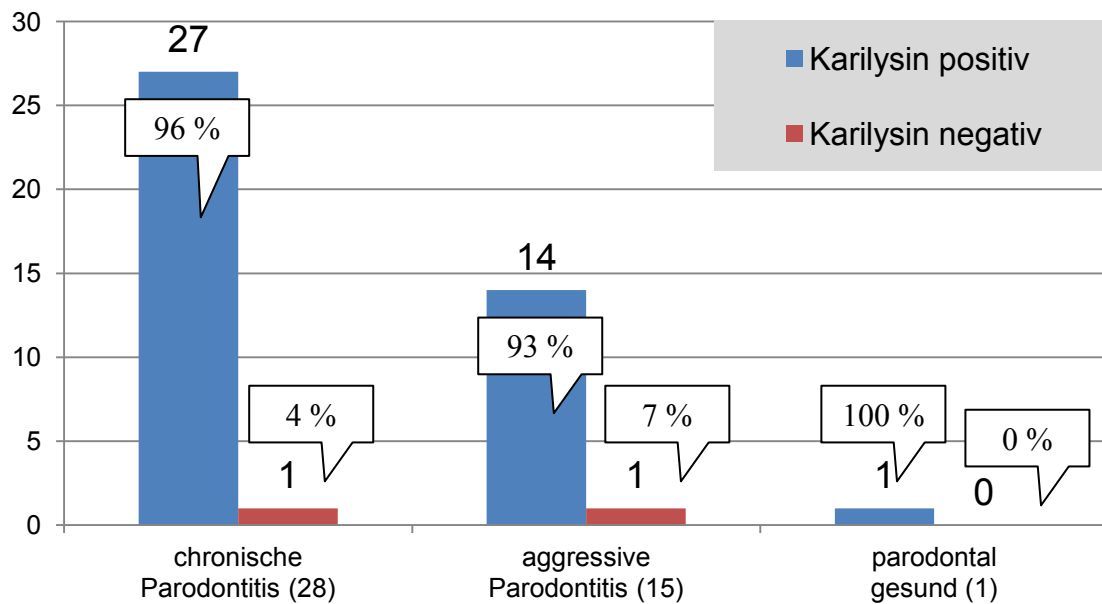


Abbildung 16: PCR-Ergebnisse für Karilysin

Fast so häufig wie die „Putative serine protease“ lag auch Karilysin positiv vor. Vom Gesamtkollektiv der Patienten mit chronischen Parodontitis (n=28) waren 27 Proben „Karilysin positiv“ und eine Probe „Karilysin negativ“. Beim Kollektiv der Patienten mit aggressiver Parodontitis konnten 14 Proben als „Karilysin positiv“ und erneut eine als „Karilysin negativ“ registriert werden. Auch die parodontal gesunde Patientenprobe erwies sich als „Karilysin positiv“ (Abbildung 16).

5.1.2.8 Thermolysin-like protease

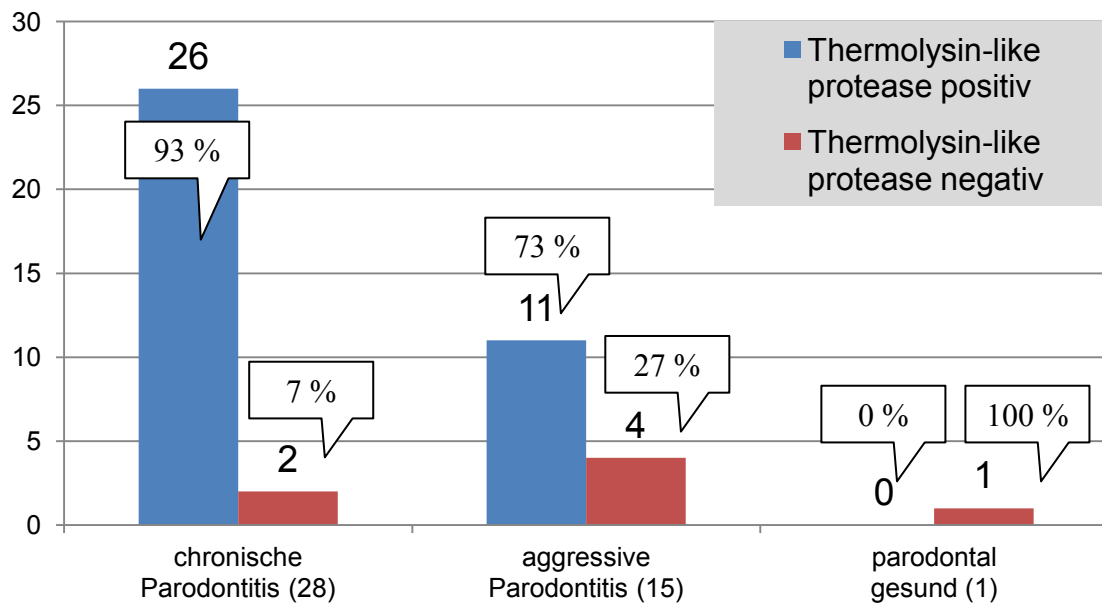


Abbildung 17: PCR-Ergebnisse für die Thermolysin-like protease

Im Patientenkollektiv mit chronischer Parodontitis (n=28) konnten 26 Proben als „Thermolysin-like protease positiv“ und zwei Proben als „Thermolysin-like protease negativ“ nachgewiesen werden. Das Kollektiv der aggressiven Parodontitis (n=15) verzeichnete 11 Proben als „Thermolysin-like protease positiv“ und vier als „Thermolysin-like protease negativ“. Ebenso konnte in der parodontal gesunden Patientenprobe keine „Thermolysin-like protease“ nachgewiesen werden (Abbildung 17).

5.1.2.9 Miropsin (Trypsin-like protease b)

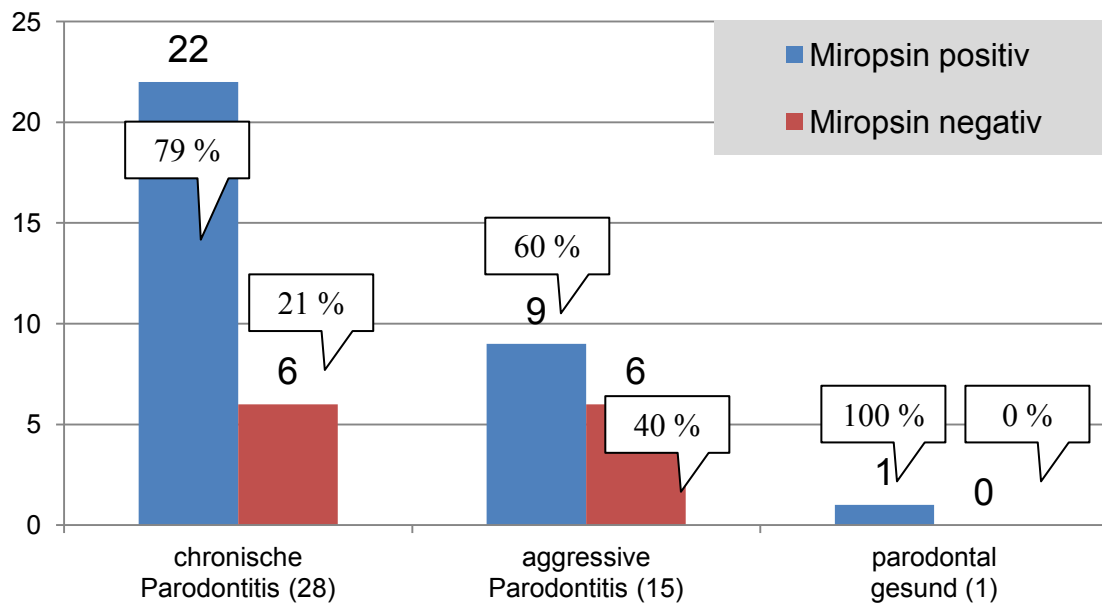


Abbildung 18: PCR-Ergebnisse für Miropsin

Im Patientenkollektiv der chronischen Parodontitis (n=28) konnten 22 Proben als „Miropsin positiv“ und sechs Proben als „Miropsin negativ“ nachgewiesen werden. Deutlich geringer war die Prävalenz beim Kollektiv der aggressiven Parodontitis mit neun Proben „Miropsin positiv“ und sechs Proben „Miropsin negativ“. Die parodontal gesunde Patientenprobe konnte als „Miropsin positiv“ registriert werden (Abbildung 18).

5.1.3 Zusammenfassung aller Proteasen

5.1.3.1 Datenbasis

In Tabelle 3 sind nochmals alle untersuchten Proteasen in Form einer Datenbank zusammengefasst.

Tabelle 3: Datenbasis für die untersuchten Proteasen

Protease		chronische	aggressive	Parodontal gesund
		Parodontitis		
Karipsin	Karipsin positiv	27	15	0
	Karipsin negativ	1	0	1
Bartolysin	Bartolysin positiv	24	13	0
	Bartolysin negativ	4	2	1
Putative subtilisin-like	Putative subtilisin-like positiv	27	15	1
	Putative subtilisin-like negativ	1	0	0
Putative serine	Putative serine positive	28	15	1
	Putative serine negativ	0	0	0
Trypsin-like	Trypsin-like positiv	22	10	0
	Trypsin-like negativ	6	5	1
Legumain-like	Legumain-like positiv	22	9	1
	Legumain-like negativ	6	6	0
Karilysin	Karilysin positiv	27	14	1
	Karilysin negativ	1	1	0
Thermolysin-like	Thermolysin-like positiv	26	11	0
	Thermolysin-like negativ	2	4	1
Miropsin	Miropsin positiv	22	9	1
	Miropsin negativ	6	6	0

5.1.3.2 Auswertung nach Rangfolge

Nachfolgend wird in Tabelle 4 bis 6 eine Rangfolge der einzelnen Proteasen im entsprechenden Krankheitsbild dargestellt.

Tabelle 4: Rangfolge bei chronischer Parodontitis

Protease	Rang	Positiv	Negativ
Putative serine	1	28	0
Karipsin	2	27	1
Putative subtilisin-like	2	27	1
Karilysin	2	27	1
Thermolysin-like	5	26	2
Bartolysin	6	24	4
Trypsin-like	7	22	6
Legumain-like	7	22	6
Miropsin	7	22	6

28 Probanden

Von allen Patientenproben mit chronischer Parodontitis (n=28), welche „T. forsythia positiv“ waren, konnte die „Putative serine protease“ zu 100% nachgewiesen werden. Auch Karipsin, Karilysin und die „Putative subtilisin-like protease“ erwiesen mit 96% eine sehr hohe Prävalenz. Am geringsten war die Prävalenz von Miropsin mit 79% (Tabelle 4).

Tabelle 5: Rangfolge bei aggressiver Parodontitis

Protease	Rang	Positiv	Negativ
Karipsin	1	15	0
Putative subtilisin-like	1	15	0
Putative serine	1	15	0
Karilysin	4	14	1
Bartolysin	5	13	2
Thermolysin-like	6	11	4
Trypsin-like	7	10	5
Legumain-like	8	9	6
Miropsin	8	9	6

15 Probanden

Von allen Patientenproben mit aggressiver Parodontitis (n=15), welche „T. forsythia positiv“ waren, konnten Karipisin, „Putative subtilisin-like protease“ und „putative serine protease“ zu 100% nachgewiesen werden. Vergleichsweise selten war die Prävalenz von Miropsin und „Legumain-like protease“ mit jeweils 60% (Tabelle 5).

Tabelle 6: Rangfolge parodontal gesund

Protease	Rang	Positiv	Negativ
Putative subtilisin-like	1	1	0
Putative serine	1	1	0
Legumain-like	1	1	0
Karilysin	1	1	0
Miropsin	1	1	0
Karipsin	6	0	1
Bartolysin	6	0	1
Trypsin-like	6	0	1
Thermolysin-like	6	0	1

1 Proband

Bei nur einer „T. forsythia positiven“ Patientenprobe lässt sich kein repräsentativer Rückschluss auf ein Kollektiv in Form einer Rangfolge ziehen. Tabelle 6 zeigt nochmals, welche Proteasen bei unserer einen „T. forsythia positiven“ Patientenprobe als Bande im Agarosegel unter dem UV-Transilluminator zu verzeichnen war (Tabelle 6).

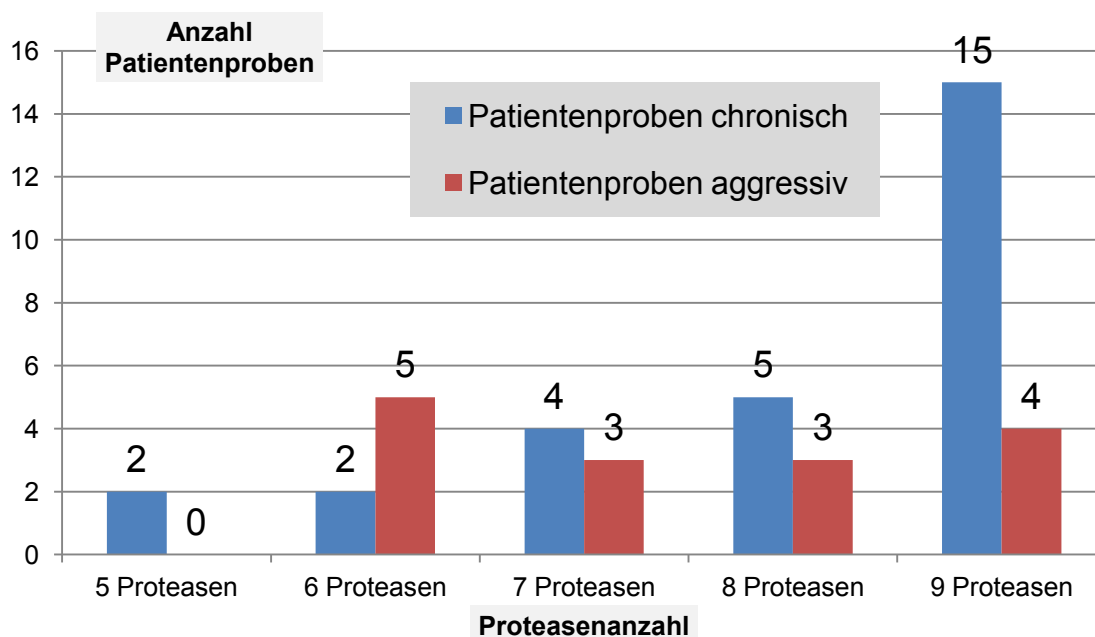


Abbildung 19: Anteil Proteasen an Patientenproben

Die in der Ordinatenachse dargestellte Anzahl an Patientenproben bezieht sich bei chronischer Parodontitis (blau unterlegt) auf 28 Proben und bei aggressiver Parodontitis (rot unterlegt) auf 15 Proben. Die Abszissenachse beschreibt die Gesamtzahl an Proteasen beginnend bei mindestens 5 bis maximal 9. Auffällig ist, dass 54% (15 von 28) aller Patientenproben mit chronischer Parodontitis über alle 9 Proteasen verfü-

gen. Bei Patientenproben mit aggressiver Parodontitis erwiesen sich nur 27% (4 von 15) als Träger von allen 9 Proteasen (Abbildung 19).

5.2 micro-Ident® PCR

Im Anschluss an den Hauptteil der vorliegenden Studie sollten außerdem mittels micro-Ident® PCR die Konzentrationen der fünf bedeutenden parodontopathogenen Bakterien im Hinblick auf unterschiedliche Taschentiefen bestimmt werden. Besonderen Fokus legten wir natürlich auf die Konzentration von T. forsythia in Abhängigkeit der Taschentiefen von 2-,4-und 6mm (Tabelle 7).

Tabelle 7: Keimkonzentration in Abhängigkeit der Taschentiefe

Probe	Taschentiefe														
	a = 2 mm					b = 4 mm					c = 6 mm				
	Aa	Pg	Pi	Tf	Td	Aa	Pg	Pi	Tf	Td	Aa	Pg	Pi	Tf	Td
1	-	+	-	-	-	-	++	+	-	-	-	+++	++	++	-
2	-	++	+	+	-	-	+++	+	++	-	-	+++	+	++	-
3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
4	++	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	+	-
5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	(+)	-	++	+	+	+
6	-	-	-	-	-	-	+++	++	+	++	-	+++	++	++	++
7	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	++	+
10	(+)	-	-	-	-	(+)	-	+	+	-	+++	+	-	-	-

- +++ sehr stark erhöhte Keimkonzentration
- ++ stark erhöhte Keimkonzentration bei T.f.
- ++ stark erhöhte Keimkonzentration
- + erhöhte Keimkonzentration
- (+) Keimkonzentration an Nachweisgrenze
- Keimkonzentration unter Nachweisgrenze

Tabelle 8: Datenbasis zur Auswertung der Keimkonzentration

	a = 2 mm			b = 4 mm			c = 6 mm		
	erhöht	stark erhöht	sehr stark erhöht	erhöht	stark erhöht	sehr stark erhöht	erhöht	stark erhöht	sehr stark erhöht
Aa	0	1	0	1	0	0	0	0	3
Pg	2	1	0	2	1	2	2	3	3
Pi	1	0	0	3	1	0	3	2	0
Tf	1	0	0	1	1	0	2	4	0
Td	0	0	0	0	1	0	2	1	0

Tabelle 8 zeigt numerisch, Abbildung 19 graphisch, die Anzahl der positiven Probanden für die jeweilige Kombination aus Parodontitiseim, Keimkonzentration und Taschentiefe.

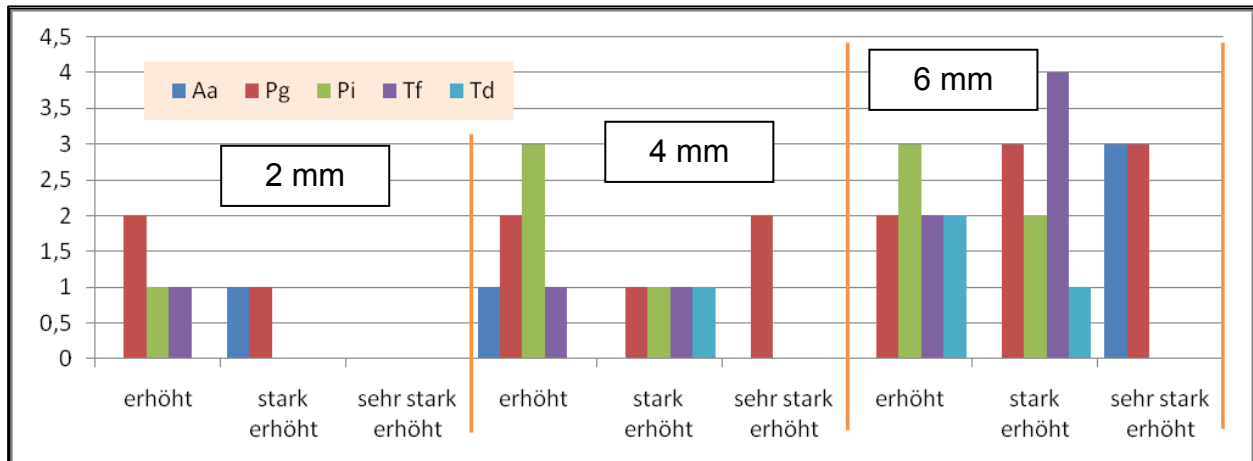


Abbildung 20: Keimkonzentration für untersuchte Parodontitiseime

Wie aus Tabelle 8 und Abbildung 20 hervorgeht, lässt sich vereinfacht feststellen, dass unsere getesteten Probanden in tieferen Taschen höhere Konzentrationen an parodontopathogenen Bakterien aufweisen.

Die Keimkonzentration von *A. actinomycetemcomitans* stand auffällig mit der Taschentiefe in Korrelation. Dabei fiel auf, dass *A. actinomycetemcomitans* nur sehr selten in Taschentiefen von 2- und 4mm anzutreffen war. Dafür konnten in einer Tie-

fe von 6mm drei von 10 Probanden mit einer sehr stark erhöhten Keimkonzentration detektiert werden.

Auffällig wurde *P. gingivalis* und dessen erhöhtes bzw. stark erhöhtes Vorkommen bei drei von 10 Probanden in nur 2mm Taschentiefe. Die Hälfte der Probanden wiesen mindestens erhöhte Keimkonzentrationen in 4mm Taschentiefe auf. In 6mm Tiefe konnte eine weitere Steigerung der Keimkonzentration registriert werden, da in acht von 10 Patientenproben mindestens eine erhöhte Keimkonzentration nachgewiesen werden konnte.

Die Keimkonzentrationen von *P. intermedia* unterschieden sich in 4- und 6mm Taschentiefe kaum voneinander. In 2mm Tiefe konnte nur bei einem Probanden eine erhöhte Konzentration an *P. intermedia* festgestellt werden.

T. denticola konnte ebenfalls vorrangig in 6mm Taschentiefe zum Nachweis gebracht werden, dabei enthielten drei der 10 Patientenproben mindestens eine erhöhte Keimkonzentration.

Fokussiert betrachtet auf *T. forsythia*, verdeutlicht Abbildung 21 den Zusammenhang zwischen Taschentiefe und Keimkonzentration. Hierbei wird deutlich, dass mit zunehmender Taschentiefe die Keimkonzentration von *T. forsythia* steigt. Während in Taschentiefen von 2- und 4mm nur ein bzw. zwei Probanden von 10 eine erhöhte oder stark erhöhte Konzentration an *T. forsythia* aufweisen, ist im Milieu von 6mm ein signifikanter Unterschied zu erkennen. Dabei konnten in 6 von 10 Patientenproben *T. forsythia* nachgewiesen werden. Um genauer zu sein, konnten zwei Proben mit einer erhöhten - und vier Proben mit einer stark erhöhten Keimkonzentration detektiert werden.

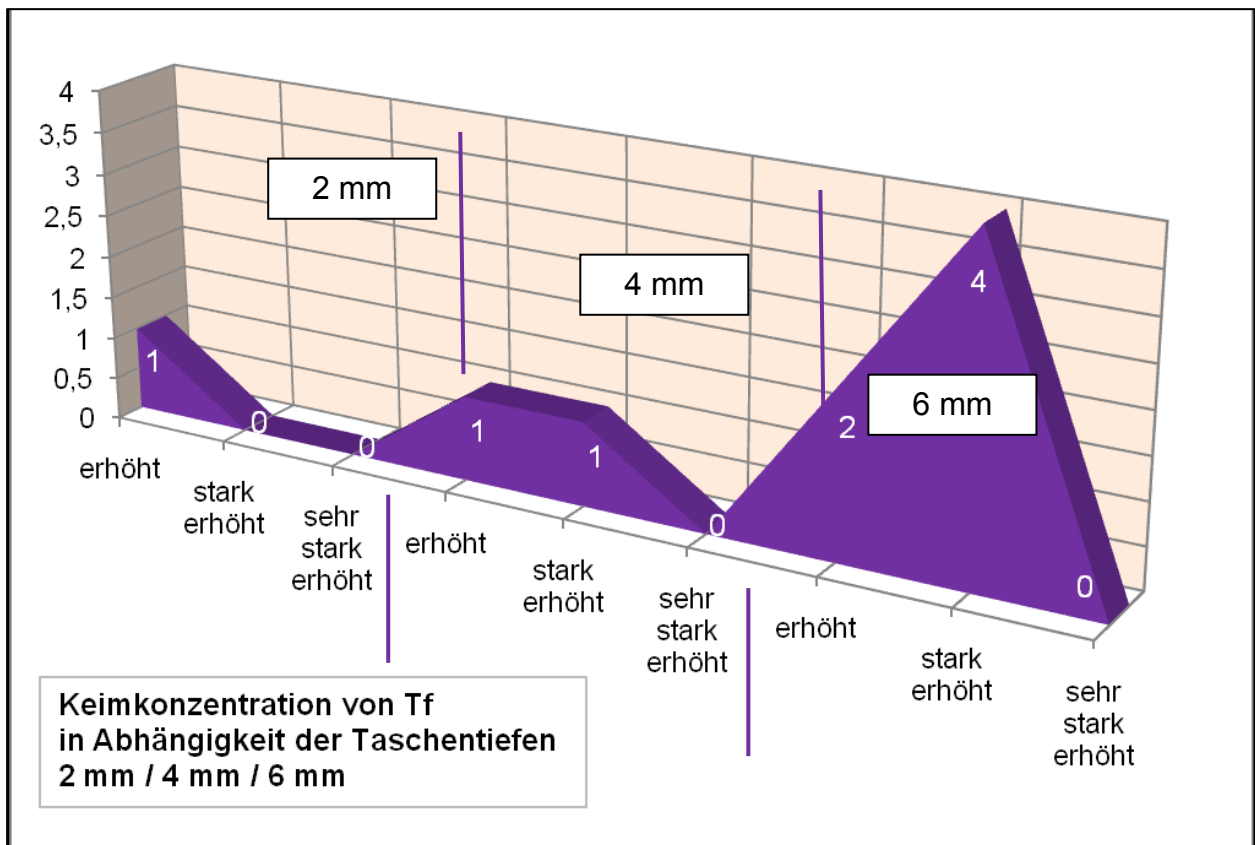


Abbildung 21: Keimkonzentration für *T. forsythia*

5.3 mRNA Expression von Proteasengenen

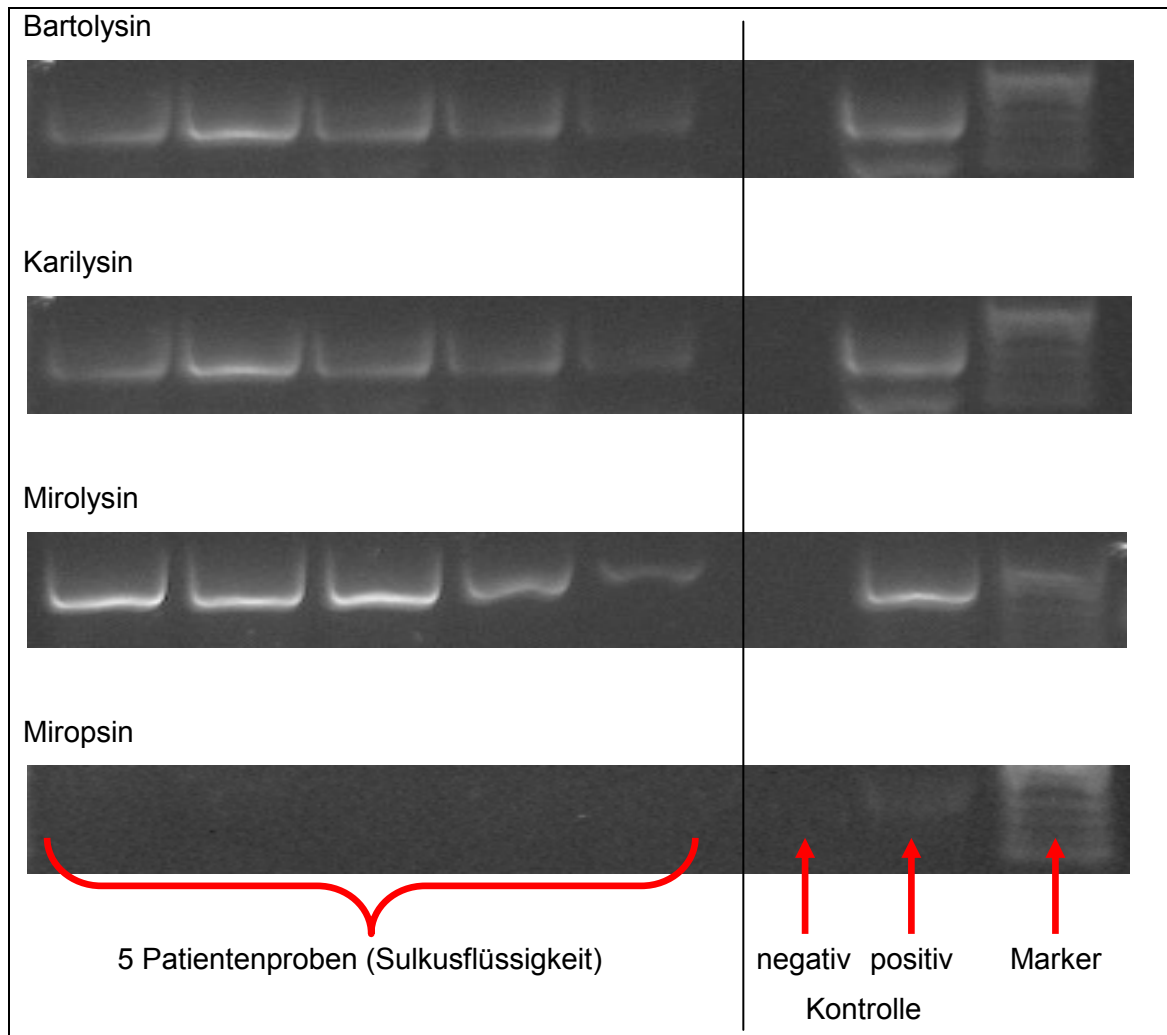


Abbildung 22: Agarosegel einzelner Proteasen von *T. forsythia* mittels cDNA

Im letzten Teilversuch der vorliegenden Studie sollten Proteasengene im gingivalen Sulkus mittels mRNA Extraktion und anschließender reversen Transkriptase in eine cDNA nachgewiesen werden. Die cDNA lieferte die Möglichkeit, über eine konventionelle PCR einzelne Proteasengene von *T. forsythia* zu detektieren. Dabei handelte es sich um Bartolysin, Karilysin, Mirolysin und Miropsin. Abbildung 22 zeigt ein Elektrophoresegel der vier ausgewählten Proteasen unter dem UV-Transilluminator. Alle fünf Patientenproben kristallisierten sich als „positiv“ auf das Vorhandensein der Proteasengene Bartolysin, Karilysin und Mirolysin. Miropsin konnte in diesem Versuch nicht nachgewiesen werden.

6 Diskussion

Die Parodontitis wurde schon von Axelsson (1994) als Infektionserkrankung definiert, die von starker Vermehrung ortsansässiger Bakterien, Zunahme der Virulenz von Bakterien oder durch die Etablierung parodontopathogener Anaerobier gekennzeichnet ist. Auch Rateitschak (1989) registrierte sehr früh einen Zusammenhang der körpereigenen Abwehr dieser Mikroorganismen und die dadurch ausgelösten immunologischen Vorgänge. Die heute als multifaktorielle Infektionskrankheit allgemein anerkannte Parodontitis (Wolf et al 2004) ist besonders auf die mikrobielle Besiedlung zurückzuführen, welche als Hauptauslöser der Krankheit bekannt ist. Aus der Gesamtheit aller oralen Bakterienarten ist eine kleine Gruppe von Markerkeimen mit der Ausprägung des Krankheitsbildes sowohl der aggressiven als auch der chronischen Parodontitis assoziiert. Dazu gehören unter anderem *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola* und *T. forsythia* (Genco et al. 1996, Umeda et al. 1998, Palantonio et al. 2000, Gutsche et al. 2004).

Somit wurde das parodontopathogene Potential von *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia* und *T. denticola* bereits in zahlreichen Studien belegt (Genco et al. 1996, Buchmann 1999, Takeuchi et al. 2001). In der vorliegenden Studie haben wir uns auf die mikrobiologische Diagnostik von *T. forsythia* konzentriert, um in drei verschiedenen Herangehensweisen die Bedeutung von *T. forsythia* als Hauptkeim der Parodontitis zu unterstreichen. Dabei sollte besonders die Rolle der gewebedestruierenden Proteasen in Hinblick auf deren Vorkommen im gingivalen Sulkus näher beleuchtet werden.

6.1 Prävalenz von *T. forsythia* und deren Proteasen im gingivalen Sulkus

Das Hauptanliegen des ersten Teilversuches bestand im qualitativen Nachweis des hoch parodontopathogenen Bakteriums *T. forsythia* im gingivalen Sulkus aus einem Patientenkollektiv von 68 Plaqueproben. Näher untersucht wurde die Prävalenz diverser Proteasen von *T. forsythia* zwischen den Krankheitsbildern sowohl der chronischen - und aggressiven Parodontitis als auch bei parodontal gesunden Probanden.

Der mikrobiologische Nachweis erfolgte mittels konventioneller PCR anhand eines exakten PCR-Protokolls, welche sich als zuverlässige Methode darstellte. Die von Ashimoto et al (1996) definierten Primer für *T. forsythia* und deren Proteasen erwiesen sich für unsere Testreihe als geeignet. Der Stamm *T. forsythia* ATCC 43330 wurde als Positivkontrolle verwendet.

Bezugnehmend auf den Ergebnisteil lässt sich feststellen, dass *T. forsythia* in allen drei Versuchsgruppen nachweisbar war. In 89% aller aggressiven Parodontitisproben konnte *T. forsythia* im subgingivalen Plaque detektiert werden und stellte damit prozentual die stärkste Gruppe dar. Ähnliche Ergebnisse erzielten die chronischen Parodontitisproben mit einem Anteil von 76% an *T. forsythia* positiven Plaqueproben. Selbst beim kleinen Kollektiv der parodontal gesunden Probanden konnte in einer Probe (17%) das hoch parodontopathogene Bakterium *T. forsythia* nachgewiesen werden und stellt damit die prozentual kleinste Gruppe dar. Die Ergebnisse unterstreichen, dass *T. forsythia* in beiden Parodontitiden eine wesentliche Rolle im Hinblick auf Prävalenz spielt, aber auch parodontal gesunde Probanden zu geringem Anteil Träger dieses Bakterium sind. Bestätigt wurden unsere Ergebnisse durch eine Untersuchung von Radek et al. (2004). In dieser klinischen Studie konnten keine wesentlichen quantitativen oder qualitativen Unterschiede im Bezug auf das Verteilungsmuster von *T. forsythia* bei Patienten mit der klinischen Diagnose einer chronischen- oder aggressiven Parodontitis festgestellt werden.

Die erzielten Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die bis jetzt bekannten neun Proteasen von *T. forsythia* eine signifikante Stellung als Virulenzfaktor einnehmen. Herausragend im Hinblick auf Prävalenz war die „Putative serine protease“, welche zu 100% sowohl in den chronischen- und aggressive Parodontitisproben als auch bei einer *T. forsythia*-positiven Probe eines parodontal gesunden Probanden nachweisbar war.

Ähnlich dominant war die Stellung von Karipsin, Karilysin und der „Putative subtilisin-like protease“ mit einer Prävalenz von jeweils 96% aller chronischen Parodontitisproben. Mit 79% war das Vorkommen der „Legumain-like protease“ verhältnismäßig gering, ebenso wie bei Miropsin (Trypsin-like protease b) und der „Trypsin-like protease“. Trypsin-ähnliche Enzyme stellen bei der Gewebezerstörung

des Parodonts einen wichtigen Faktor dar (Potempa und Pike 2009). Weitere internationale Studien belegen, dass Karilysin („matrix metalloprotease-like enzyme“) zur Zerstörung des parodontalen Gewebes beiträgt und somit die Entwicklung einer chronischen Parodontitis fördert (Koziel et al. 2010, Karim et al. 2010).

Die Ergebnisse der Prävalenz von *T. forsythias* Proteasen bei aggressiven Parodontitisproben decken sich mit den zuvor erwähnten Ergebnissen der chronischen Parodontitis. Auch hier waren neben der „Putativen serine protease“, Karipsin und die „Putative subtilis-like protease“ in der Rangfolge auf Platz 1 mit 100%. Erneut war die Prävalenz von „Trypsin-like protease“ mit 76% bzw. „Legumain-like protease“ und Miropsin mit jeweils 60% in der Rangfolge am geringsten. Vereinfacht lässt sich feststellen, dass es in unserer Studie keine deutlichen Unterschiede in der Prävalenz von Proteasen von *T. forsythia* zwischen chronischen- und aggressiven Parodontitisproben gibt.

Ein markanter Unterschied geht jedoch aus Abbildung 19 hervor. Hierbei wird sichtbar, dass in 54% der chronischen Parodontitisproben alle neun Proteasen nachweisbar waren. Auf der anderen Seite konnten nur in 27% der aggressiven Parodontitisproben alle Proteasen detektiert werden. Die Verteilung im Hinblick auf die Proteasenzahl ist in diesem Kollektiv wesentlich breiter gefasst und nicht so eindeutig wie beim Kollektiv der chronischen Parodontitis. Dieser erwähnte Zusammenhang lässt sich hypothetisch mit den unterschiedlichen Krankheitsbildern beider Parodontitiden belegen. Die aggressive Parodontitis imponiert durch lokalen, raschen Attachmentverlust und einen nicht voll strukturierten subgingivalen Biofilm (Armitage 1999). Der wesentlich höher strukturierte Biofilm ist unter anderem Leitbild der chronischen Parodontitis (Costerton et al. 1999). Es ist möglich, dass die dort etablierten *T. forsythia*-Stämme unter diesen anaeroben Verhältnissen eine größere Gesamtzahl an Proteasen aufweisen. Dieser Aspekt ist jedoch rein hypothetisch zu betrachten und bedarf weiterer Grundlagenforschung der Proteasenaktivität von *T. forsythia*.

Bei der hier vorliegenden Studie handelt es sich um eine verblindete Querschnittsuntersuchung von Patientenproben des Universitätsklinikum Jena. Weitere Studien sollten die Proteasenprävalenz mit eindeutigeren Parametern belegen. Mögliche Parameter wären Lebensalter, Geschlecht, Ernährung, Alkoholkonsum,

Schulbildung, Herkunft, körperlicher Zustand, aber auch Nikotinkonsum oder Diabetes mellitus.

6.2 Nachweis von *T. forsythia* mittels micro-Ident

Unter Einbeziehung des klinischen Parameters „Taschentiefe“ sollte im zweiten Teilversuch ein Bezug zur Keimkonzentration von parodontopathogenen Bakterien hergestellt werden. Besonders Fokus galt der Flora am Taschenfundus und der Spezies *T. forsythia*.

Die Versuchsdurchführung erfolgte mittels micro-Ident[®]-PCR, ein semiquantitatives Messverfahren, welches auf visueller Beurteilung der Bandenstärke auf einem Nitrozellulosestreifen nach reverser DNA-Hybridisierung basiert. Es besteht eine gute Übereinstimmung zu Real-time PCR (Eick et al. 2011). Die subgingivalen Proben stammten von 10 Probanden mit chronischer Parodontitis aus drei unterschiedlichen Sondierungstiefen (2-, 4- und 6mm).

Unser Anliegen war es herauszufinden, ob sich die Schlüsselpublikation von Socransky (1998) mit unseren Ergebnissen bewahrheitet. Laut Socransky soll als gesichert gelten, dass der „rote“ Komplex der subgingivalen Bakterien stark mit Taschentiefe und Bleeding on probing (BOP) assoziiert ist.

Die These von Socransky deckt sich mit unseren Ergebnissen. Sowohl bei den als Spätbesiedler bekannten Spezies *T. forsythia* und *P. gingivalis*, welche dem „roten“ Komplex angehören, als auch bei *A. actinomycetemcomitans* konnten in einer Taschentiefe von 6mm stark erhöhte Keimkonzentrationen, teilweise sogar sehr stark erhöhte Keimkonzentrationen registriert werden. Aber auch *P. intermedia*, Vertreter des „orangenen“ Komplex und als Brückenspezies bekannt, zeigte eine Abhängigkeit von Taschentiefe und Keimkonzentration in unserer Studie. Diese sehr stark erhöhten Keimkonzentrationen in 6mm Taschentiefe sind bedingt durch die anaeroben Verhältnisse, welche z.B. in 2mm Taschentiefe nicht gegeben sind und somit in diesem Milieu keine sehr stark erhöhten Keimkonzentrationen nachweisbar waren (Müller 2001).

6.3 mRNA Expression von Proteasengen

Im Bezug auf den Ergebnissteil der mRNA Expression konnte nachgewiesen werden, dass Proteasengene von *T. forsythia* in vivo exprimiert werden. Die Gene von Bartolysin, Karilysin und Mirolysin stellten sich durch gleichmäßige Banden im Elektrophoresegel dar. Miropsin war hingegen im Elektrophoresegel nicht sichtbar und hat somit eine Ausnahmestellung. Selbst die Positivkontrolle von Miropsin war nur sehr schwach zu erkennen. Wahrscheinlich lagen somit methodische Probleme vor, warum sich Miropsin in klinischen Proben nur schwer nachweisen ließ.

Die eigentliche Zielstellung, Proteasen von *T. forsythia* separat im gingivalen Sulkus nachzuweisen, musste verworfen werden, da für solch eine Antigen - Antikörper Reaktion die passenden Antikörper nicht zur Verfügung standen. Somit wählten wir einen indirekten Weg für den Nachweis der Proteasen im gingivalen Sulkus. Wir nehmen an, dass einzelne Proteasen nach abgeschlossener intrazellulärer Translation der mRNA an den Ribosomen von der Zelle über spezielle Transportmechanismen in den gingivalen Sulkus freigesetzt werden. Der positive mRNA Nachweis der Gene von Bartolysin, Karilysin und Mirolysin lässt uns vermuten, dass diese Proteasen auch in der Sulkusflüssigkeit ihre destruierende Wirkung auf den Zahnhalteapparat entfalten.

Einer weiteren Studie wird es vorbehalten sein, ob Proteasen nur an den oralen Mikroorganismen anzutreffen sind oder ob sie, wie von uns vermutet, auch in der Sulkusflüssigkeit unabhängig von den Bakterien ihrer Funktion nachgehen. Dieser Versuch sollte mit passenden Antikörpern gegen die Proteasen zu realisieren sein. Von großem Interesse wäre es außerdem, das Expressionslevel der mRNA mit dem Grad der parodontalen Erkrankung zu korrelieren.

7 Schlussfolgerung

Die mikrobiologischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen in allen drei Teilversuchen, dass die Spezies *T. forsythia* eindeutig sowohl mit dem Krankheitsbild der chronischen- als auch aggressiven Parodontitis assoziiert ist.

Mittels konventioneller PCR konnte eine sehr hohe Prävalenz von *T. forsythia* in chronischen - und aggressiven Patientenproben registriert werden, jedoch wurde keine auffällige Assoziation von *T. forsythia* zu einem der beiden Krankheitsbilder deutlich. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass auch parodontal gesunde Probanden Träger dieses Parodontitis Leitkeimes sind. Im Hinblick auf die Proteasenaktivität stand die „Putative serine protease“ mit einer Prävalenz von 100% bei beiden Parodontitiden und in einer *T. forsythia* enthaltenen Proben eines parodontal gesunden Probanden an erster Stelle. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Prävalenz aller bekannten Proteasen von *T. forsythia* zwischen den beiden Krankheitsbildern der chronischen und aggressiven Parodontitis festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass circa die Hälfte aller chronischen Parodontitisproben über alle neun Proteasen verfügen, hingegen nur ein Viertel bei aggressiven Patientenproben.

Als Mitglied des „roten“ Komplexes konnte das gramnegative, anaerobe Bakterium *T. forsythia* mittels micro-Ident[®] PCR eine starke Abhängigkeit zwischen Taschentiefe und Keimkonzentration zugeschrieben werden. In Taschentiefen von 6mm registrierten wir in über der Hälfte aller getesteten Parodontitisproben erhöhte bis stark erhöhte Keimkonzentrationen an *T. forsythia*, was dem anaeroben Milieu zuzuschreiben ist.

Für den indirekten Nachweis der Proteasen von *T. forsythia* im gingivalen Sulkus konnte mittels mRNA Extraktion und reverser Transkriptase der positive Nachweis erbracht werden, dass einzelne Proteasengene exprimiert werden. Dieses Ergebnis gilt es mittels einer gezielten Antigen - Antikörperreaktion zu unterstreichen.

Die Kenntnisse über Aktivität, Vorkommen und Funktion der vielen Proteasen von *T. forsythia* gilt es in nachfolgenden Studien zu vertiefen.

8 Literaturverzeichnis

- Addy M, Martin MV. 2003. Review article: systemic antimicrobials in the treatment of chronic periodontal diseases: a dilemma. *Oral Diseases*, 9(Suppl. I):38-44.
- Armitage GC. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4:1–6.
- Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. 1996. Polymerase chain reaction of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol*, 11:266–273.
- Axelsson P, Lindhe J, Nyström B. 1991. On the prevention of caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 18:182-189.
- Axelsson P. 1994. Mechanical Plaque control. In: Lang NP, Karring T (eds): *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology*. Quintessence, Chicago 1994:219.243.
- Baelum V, Fejerskov O, Manji F. 1988. Periodontal diseases in adult Kenyans. *J Clin Periodontol*, 15:445-452.
- Beikler T, Karch H, Flemming TF. 2003. Wissenschaftliche Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde - Adjuvante Antibiotika in der Parodontitistherapie.
- Borrell LN, Burt BA, Warren RC, Neighbors HW. 2006. The role of individual and neighborhood social factors on periodontitis: The third national health and nutrition examination survey. *J Periodontol*, 77:444–453.
- Braham PH, Moncla BJ. 1992. Rapid presumptive identification and further characterization of *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol*, 30:649-654.

- Buchmann R (1999) Die Grundlagen der Parodontalerkrankungen. Zahnärztl Mit 89:1700.
- Chiu B. 1999. Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. Am Heart J 138: 534-536.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284, 1318-1322.
- Croucher R, Marcenes WS, Torres MCMB, Hughes F, Sheiham A. 1997. The relationship between life-events and periodontitis. A case-control study. J Clin Periodontol 24:39-43.
- D'Aiuto F, Parkar M, Brett PM, Ready D, Tonetti MS. 2004. Gene polymorphisms in proinflammatory cytokines are associated with systemic inflammation in patients with severe periodontal infections. Cytokine, 28:29–34.
- Dannewitz B, Eickholz P. 2004. Fallbeschreibung: Generalisierte aggressive Parodontitis mit Zahnbehandlungsphobie. ZM Ausgabe 17/2004.
- de Lillo A, Booth V, Kyriacou L, Weightman AJ, Wade WG. 2004. Culture-independent identification of periodontitis-associated Porphyromonas and Tannerella populations by targeted molecular analysis. J Clin Microbiol, 42:5523–5527.
- Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR Jr, Sacco RL, Papapanou PN. 2005. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). Circulation 111: 576-582.
- Dörfer CE. 2003. Review article: antimicrobials for the treatment of aggressive periodontitis. Oral Diseases, 9(Suppl. I):51-53.

- Eick S, Straube A, Güntsch A, Pfister W, Jentsch H. 2011. Comparison of real-time polymerase chain reaction and DNA-strip technology in microbiological evaluation of periodontitis treatment. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease* 69:12-20.
- Eley BM, Cox SW. 2003. Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000 31:105-124.
- Etienne D. 2003. Review article: locally delivered antimicrobials for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Diseases*, 9(Suppl. I):45-50.
- Flemmig TH, Karch H. 1998. Adjuvante Antibiotika bei der Therapie marginaler Parodontopathien. Gemeinsame Stellungnahme DGP und DGZMK. *Dtsch Zahnärztl Z* 53, 824.
- Freyer RP. 2003. Einfluss des Interleukin 1-Genotyps auf den Therapieerfolg bei Patienten mit einer chronischen Parodontitis [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Genco R, Kornman K, Williams R, Offenbacher S, Zambon JJ, Ishikawa I, Listgarten M, Michalowicz B, Page R, Schenkein H, Slots J, Socransky S, VanDyke T. 1996. Consensus report periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol*, 1:926-932.
- Grenier D. 1995. Characterization of the trypsin-like activity of *Bacteroides forsythus*. *Microbiol* 141: 921-926.
- Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. 1994. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol*, 65:260–267.

- Gutsche G, Eger T, Zöller L, Eisele R, Lüdde R. 2004. Prävalenz und Persistenz von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythensis* bei Patienten mit aggressiver Parodontitis. *Parodontol* 15:145-155.
- Hain Lifescience 2004. Hain Lifescience (11/2004) Interne Gebrauchsanweisung. Der micro-IDent Test: S. 2.
- Han YW, Shi W, Huang GTJ, Haake SK, Park NH, Kuramitsu H, Genco RJ. 2000. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect Immun* 68:3140-3146.
- Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. 2000. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* 71: 1554-1560.
- Heidemann D. 2005. Epidemiologische Studien in Deutschland. *Parodontologie*. Vierte Auflage Elsevier, Urban&Fischer, 100.
- Heitz-Mayfield LJ. 2005. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32:196–209.
- Hugoson A, Ljungquist B, Breivik T. 2002. The relationship of some negative life-events and psychological factors to periodontal disease in an adult swedish population 50 to 80 years. *Journal of Clinical Periodontology*, 29: 247-253.
- Karim AY, Kulczycka M, Kantyka T, Dubin G, Jabaiah A, Daugherty PS, Thogersen IB, Enghild JJ, Nguyen KA, Potempa J. 2010. A Novel Matrix Metalloprotease-like Enzyme (Karilysin) of the Periodontal Pathogen *Tannerella forsythia* ATCC 43037. *Biol Chem*. 391(1): 105–117.
- Kiecolt-Glaser JK, Preacher KJ, MacCallum RC, Atkinson C, Malarkey WB, Glaser R. 2003. Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *PNAS*, 100:9090-9095.

- Kohal RJ, Dennison DK. 2000. Paradigmen in der Pathogenese parodontaler Erkrankungen. Dtsch Zahnärztl Z. 55:660-666.
- Kolenbrander PE, London J. 1993. Minireview: adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. J Bacteriol, 175:3247-3252.
- Kook JK, Sakamoto T, Nishi K, Kim MK, Seong JH, Son YN, Kim DK. 2005. Detection of *Tannerella forsythia* and/or *Prevotella intermedia* might be useful for microbial predictive markers for the outcome of initial periodontal treatment in Koreans. Microbiol Immunol, 49:9–16.
- Koziel J, Karim AY, Przybyszewska K, Ksiazek M, Rapala-Kozik M, Nguyen KA, Potempa J. 2010. Proteolytic Inactivation of LL-37 by Karylysin, a Novel Virulence Mechanism of *Tannerella forsythia*. J Innate Immun, 2:288–293.
- Lamont RJ, Yilmaz. 2002. In or out: the invasiveness of oral bacteria. Periodontol 2000, 30:61-69.
- Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK. 1993. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. PCR Methods Appl., Nr. 4: 275–287.
- Lee CH, Kho HS, Chung SC, Lee SW, Kim YK. The relationship between volatile sulfur compounds and major halitosis-inducing factors. J Periodontol 2003. 74: 32-37.
- Lindhe J, Ranney R, Lamster I, Charles A, Chung CP, Flemming T, Kinane D, Listgarten M, Loe H, Schoor R, Seymour G, Somerman M. 1999. Consensus report: chronic periodontitis. Ann Periodontol, 4:38.
- Loesche WJ. 1986 The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. Oral Microbiol Immunol, 1:65-72.

- Maiden M, Cohee P, Tanner AC. 2003. Proposal to conserve the adjectival form of the specific epithet in the reclassification of *Bacteroides forsythus* Tanner et al. 1986 to the genus *Tannerella* Sakamoto et al. 2002 as *Tannerella forsythia* corrig., gen. nov., comb. nov. Request for an Opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:2111-2112.
- Marsh P. 2003. Parodontalerkrankungen. *Orale Mikrobiologie*. Vierte Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 123.
- Micheelis W, Reich E. 1999. Dritte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS III). Ergebnisse, Trends und Problemanalysen auf der Grundlage bevölkerungsrepräsentativer Stichproben in Deutschland. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.
- Miksits K, Grossgebauer K, Hahn H. 1992. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin: Springer-Verlag, 8-10.
- Müller HP. 2001. *Parodontologie*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2001.
- Narayanan D, Hamlet S, Cullinan M, Davies R, Ellwood R, Bird P, Seymour GJ. 2005. The distribution of *Tannerella forsythia* in an adolescent and adult population. *J Periodontal Res*, 40:427–495.
- Offenbacher S. 1996. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*, 1:821-878.
- Okada H, Murakami S. 1998. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9:248-266.
- Page RC. 1993. Periodontal therapy: Prospects for the future. *J Periodontol*, 64:744-753.
- Page RC, Beck JD. 1997. Risk assessment for periodontal diseases. *Int Dent J*, 47:61-87.

- Palantonio M, Bonaventura G, Di Placido G, Tumini V, Contamo G, Di Donato A, Piccolomini R. 2000. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and clinical conditions in children and adolescents from rural and urban areas of central Italy. *J Clin Periodontol* 27:549-557.
- Pistorius A, Krahwinkel T, Willershausen B, Boekstegen C. 2002. Relationship between stress factors and periodontal disease. *European Journal of Medicine*, 7: 393-398.
- Preshaw PM, Hefti AF, Jepsen S, Etienne D, Walker C, Bradshaw MH. 2004. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis - a review. *J Clin Periodontol*, 31:697-707.
- Potempa J, Banbula A, Travis J. 2000. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol* 2000;24:153–192.
- Potempa J, Pike RN. 2009. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J Innate Immun*;1:70–87.
- Quirynen M, Dekeyser C, van Steenberghe D. 1991. The influence of gingival inflammation, tooth type and timing on the rate of plaque formation. *J Periodontol*, 62:219-222.
- Radek M, Obst CH, Krigar D, Eickholz P, Kim TS. 2004 Charakterisierung der subgingivalen Mikroflora bei aggressiver und schwerer chronischer Parodontitis. *Parodontologie* 15/3: 273–317.
- Rateitschak EM, Rateitschak KH und Wolf HF. 1989. Farbatlanten der Zahnmedizin. Bd.1.: Parodontologie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York (1989).
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487–491.

- Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. 2002. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52:841-849.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J.Clin.Periodontol.*,25:134-144.
- Socransky SS, Haffajee AD. 2000. Bakterielle Komplexe des subgingivalen Plaques (adaptiert nach Socransky & Haffajee: Dental biofilms: difficult therapeutic targets.) *Periodontol*, 28:12-55.
- Spahr A, Klein E, Khuseyinova N, Boeckh C, Muche R, Kunze M, Rothenbacher D, Pezeshki G, Hoffmeister A, Koenig W. 2006. Periodontal infections and coronary heart disease: role of periodontal bacteria and importance of total pathogen burden in the Coronary Event and Periodontal Disease (CORODONT) study. *Arch Intern Med* 166: 554-559.
- Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. 2001. *Treponema socranscii*, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 72:1354-1363.
- Tan KS, Song KP, Ong G. 2001. *Bacteroides forsythus* prfH genotype in periodontitis patients: occurrence and association with periodontal disease. *J Periodont Res* 36: 398-403.
- Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. 1979. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J. Clin.Periodontol.*, 6:278-307.
- Tanner AC, Izard J. 2006. *Tannerella forsythia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. *Periodontology* 2000, 42:88-113.

- Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL, Slots J. 1998. Risk indicators for harbouring periodontal pathogens. J Periodontol 69:1112-1119.
- van Winkelhoff AJ, van Steenberghe TJM, de Graaff J. 1988. The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. J Clin Periodontol 15:145-155.
- Walker C, Karpinia K. 2002. State of the Art Review: Rationale for Use of Antibiotics in Periodontitis. J Periodontol, 73:1188-1196.
- Wimmer G, Janda M, Wieselmann-Penkner K, Jakse N, Polansky R, Pertl C. 2002. Coping with stress: its influence on periodontal disease. Journal of Periodontology, 73:1343-1351.
- Wyss C. 1989. Dependence of proliferation of *Bacteroides forsythus* on exogenous N-acetylmuramic acid. Infect Immun, 57:1757-1759.

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungen

Abbildung 1: Orale Mikroflora	7
Abbildung 2: DNA-Extraktion mittels Spinsäule	13
Abbildung 3: Mastermix und Thermocycler.....	17
Abbildung 4: Polymerisationszyklen für den Nachweis der Protease Miropsin.....	18
Abbildung 5: Agarosegel unter UV-Transilluminator.....	19
Abbildung 6: Zuordnung von Teststreifen 2a zur Schablone	22
Abbildung 7: Konventionelle PCR, micro-Ident®-PCR und mRNA-Extraktion.....	25
Abbildung 8: PCR-Ergebnisse auf den Stamm von T. forsythia	26
Abbildung 9: PCR-Ergebnisse für die Protease Karipsin.....	27
Abbildung 10: PCR-Ergebnisse für die Protease Bartolysin	28
Abbildung 11: PCR-Ergebnisse für Mirolysin.....	29
Abbildung 12: Agarosegel von Mirolysin unter UV-Transilluminator	30
Abbildung 13: PCR-Ergebnisse für die Putative serine protease.....	30
Abbildung 14: PCR-Ergebnisse für die Trypsin-like protease.....	31
Abbildung 15: PCR-Ergebnisse für die Legumain-like protease	32
Abbildung 16: PCR-Ergebnisse für Karilysin	33
Abbildung 17: PCR-Ergebnisse für die Thermolysin-like protease	34
Abbildung 18: PCR-Ergebnisse für Miropsin	35
Abbildung 19: Anteil Proteasen an Patientenproben	38
Abbildung 20: Keimkonzentration für untersuchte Parodontitiseime.....	40
Abbildung 21: Keimkonzentration für T. forsythia	42
Abbildung 22: Agarosegel einzelner Proteasen von T.forsythia mittels cDNA.....	43

9.2 Tabellen

Tabelle 1: Übersicht verwendeter Primer zum qualitativen Bakteriennachweise mittels konventioneller PCR für <i>Tannerella forsythia</i>	15
Tabelle 2: Mastermixansatz: Beispiel für 12 Patientenproben	17
Tabelle 3: Datenbasis für die untersuchten Proteasen	36
Tabelle 4: Rangfolge bei chronischer Parodontitis	37
Tabelle 5: Rangfolge bei aggressiver Parodontitis	37
Tabelle 6: Rangfolge parodontal gesund	38
Tabelle 7: Keimkonzentration in Abhängigkeit der Taschentiefe	39
Tabelle 8: Datenbasis zur Auswertung der Keimkonzentration	40

10 Danksagung

Für die freundliche Überlassung dieser Studie und der überdurchschnittlich guten und kontinuierlichen Betreuung möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. habil. S. Eick und Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Pfister von ganzem Herzen bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. habil. E. Straube möchte ich meinen Dank aussprechen, die Einrichtungen als Doktorand am Institut für Medizinische Mikrobiologie nutzen zu dürfen.

Besonderer Dank gebührt Frau PD Dr. Eick für ihren Einsatz, ihre Geduld und außerordentliche Hilfsbereitschaft während der Versuchsreihe und beim raschen Korrigieren der einzelnen Abschnitte. Darüber hinaus ermöglichte sie mir zwei Aufenthalte an der Jagiellonian Universität in Krakau/Polen, um am „Department of Biotechnology“ weitere Versuche durchzuführen. Dies war nur möglich durch die Zusammenarbeit beider Universitäten über Frau PD Dr. Eick und Herrn Professor Jan Potempa (Leiter des „Department of Biotechnology“). Die Zeit in Krakau gemeinsam mit meinem Kollegen Stefan Hermann wird mir unvergesslich in Erinnerung bleiben.

Schließlich bin ich meiner Familie und meiner Freundin dankbar für die besondere und moralische Unterstützung während der letzten Jahre.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Gäßner, Sebastian

Geburtsdatum: 08.08.1983

Geburtsort: Leipzig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/1990 – 06/1994 Grundschule Leipzig / Wiederitzsch

08/1994 – 06/2000 Leibnizschule – Gymnasium Leipzig

09/2000 – 07/2001 High-School Aufenthalt in Pennsylvania / USA

09/2001 – 06/2003 Abitur

Zivildienst:

08/2003 – 05/2004 Universitätsklinikum Leipzig

Studium:

10/2004 – 07/2009 Studium der Zahnmedizin an der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

03/2007 Zahnärztliche Vorprüfung an der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

08/2009 – 12/2009 Staatsexamen Zahnmedizin an der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

seit 04/2009 Assistenz Zahnarzt in Leipzig

Leipzig, den 20.04.2011

12 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. habil. Sigrun Eick, Prof. Dr. med. Wolfgang Pfister
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Leipzig, den 20.04.2011

Sebastian Gäßner, Verfasser